

**NIEDERMOLEKULARE INHALTSSTOFFE
AUS VISCUM ALBUM L. UND
HPLC-STANDARDISIERUNG VON MISTELPRÄPARATEN**

BERNHARD FEIL

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Niedermolekulare Inhaltsstoffe aus Viscum album L.
und HPLC-Standardisierung
von Mistelpräparaten

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Bernhard Feil
aus
München

April 1986

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. W a g n e r
2. Berichterstatter: Professor Dr. K. T h o m a
Tag der mündlichen Prüfung: 20. Juni 1986

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
2.	Die Bedeutung der Kunst	2
3.	Die Kunst des Altertums	3
4.	Die Kunst des Mittelalters	4
5.	Die Kunst der Renaissance	5
6.	Die Kunst des Barock	6
7.	Die Kunst des 18. Jahrhunderts	7
8.	Die Kunst des 19. Jahrhunderts	8
9.	Die Kunst des 20. Jahrhunderts	9
10.	Die Kunst der Gegenwart	10
11.	Die Kunst der Zukunft	11
12.	Die Kunst der Vergangenheit	12
13.	Die Kunst der Gegenwart	13
14.	Die Kunst der Zukunft	14
15.	Die Kunst der Vergangenheit	15
16.	Die Kunst der Gegenwart	16
17.	Die Kunst der Zukunft	17
18.	Die Kunst der Vergangenheit	18
19.	Die Kunst der Gegenwart	19
20.	Die Kunst der Zukunft	20
21.	Die Kunst der Vergangenheit	21
22.	Die Kunst der Gegenwart	22
23.	Die Kunst der Zukunft	23
24.	Die Kunst der Vergangenheit	24
25.	Die Kunst der Gegenwart	25
26.	Die Kunst der Zukunft	26
27.	Die Kunst der Vergangenheit	27
28.	Die Kunst der Gegenwart	28
29.	Die Kunst der Zukunft	29
30.	Die Kunst der Vergangenheit	30
31.	Die Kunst der Gegenwart	31
32.	Die Kunst der Zukunft	32
33.	Die Kunst der Vergangenheit	33
34.	Die Kunst der Gegenwart	34
35.	Die Kunst der Zukunft	35
36.	Die Kunst der Vergangenheit	36
37.	Die Kunst der Gegenwart	37
38.	Die Kunst der Zukunft	38
39.	Die Kunst der Vergangenheit	39
40.	Die Kunst der Gegenwart	40
41.	Die Kunst der Zukunft	41
42.	Die Kunst der Vergangenheit	42
43.	Die Kunst der Gegenwart	43
44.	Die Kunst der Zukunft	44
45.	Die Kunst der Vergangenheit	45
46.	Die Kunst der Gegenwart	46
47.	Die Kunst der Zukunft	47
48.	Die Kunst der Vergangenheit	48
49.	Die Kunst der Gegenwart	49
50.	Die Kunst der Zukunft	50

für Centa
für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
ALLGEMEINER TEIL	2
KAPITEL 1: Viscum album L.	2
<u>I.</u> Kenntnisstand über Viscum album L.	2
1. Systematik und Verbreitung	2
2. Botanische Beschreibung	5
3. Historischer Überblick und volksmedizinische Verwendung	5
4. Bisher bekannte Inhaltsstoffe	8
4.1. Hochmolekulare Inhaltsstoffe	8
4.2. Niedermolekulare Inhaltsstoffe	8
<u>II.</u> Bisherige Versuche zur Identifizierung bzw. Charakterisierung von Mistel-Extrakten	12
<u>III.</u> Dünnschichtchromatographie der Drogenextrakte und Nachweis bisher nicht beschriebener, neuer Verbindungen	13
<u>IV.</u> Isolierung und Strukturaufklärung	14
1. Isolierung	14
1.1. Säulenchromatographie	15
1.2. Präparative Dünnschichtchromatographie	15
2. Strukturaufklärung der Substanz A	16
2.1. Massenspektren	16
2.2. Hydrolyse und Identifizierung der Zucker	18
2.3. Methylierungsanalyse	21
2.4. ¹ H-NMR-Spektroskopie	25
2.5. ¹³ C-NMR-Spektroskopie	25
3. Strukturaufklärung der Substanz B	27
4. Identifizierung von Substanz C	30
5. Identifizierung von Substanz D	32

<u>KAPITEL 2:</u>	Die Analytik von Viscum album-Extrakten und	
	-Spezialitäten	35
<u>I.</u>	Dünnschichtchromatographie	35
<u>II.</u>	HPLC-Analyse der Mistelextrakte	37
1.	Das Trennsystem	37
2.	Probenvorbereitung	37
3.	Vergleich DC/HPLC	39
4.	Weitere Charakterisierung dieser Verbindungen mit Hilfe der Photodiodenarray-Technik	41
4.1.	Kontrolle der Peakreinheit	43
4.2.	3-dimensionale Darstellung des HPLC-Chromato- gramms	43
4.3.	Isoabsorbance plot	43
5.	Quantitative Bestimmung der Phenylpropan- derivate im Drogenextrakt	45
5.1.	Probenaufbereitung	45
5.2.	Innerer Standard	46
5.3.	Eichgeraden	47
5.4.	Responsefaktoren	48
5.5.	Genauigkeit der Methode	50
5.5.1.	Standardabweichung	50
5.5.2.	Wiederfindungsrate	50
5.6.	Ergebnisse der quantitativen Bestimmungen	51
<u>III.</u>	Analyse von mistelhaltigen Fertigpräparaten	54
1.	DC und HPLC von Preß- und Gärsäften	55
2.	Analyse von Asgoviscum ^R und Asgoviscum forte ^R liquid.	61
2.1.	Quantitative Bestimmung der Phenylpropan- derivate	61
2.1.1.	In Tinct. Visci albi	61
2.1.2.	Im Fertigpräparat Asgoviscum ^R bzw. Asgovis- cum forte ^R liquid.	63
2.1.2.1.	Ergebnisse	63
2.1.2.2.	Untersuchung mehrerer Chargen unterschied- licher Lagerungszeit	65

	Seite
2.2.	Nachweis und Analyse weiterer Bestandteile von Asgoviscum forte ^R 66
2.2.1.	Crataegi fructus 66
2.2.2.	Allii sativi bulbus 67
2.2.3.	Zimtöl 67
2.2.4.	Hydroxymethylrutin 68
2.2.5.	Rauwolfiae serpentinae rad. 68
3.	Analyse weiterer mistelhaltiger Fertigprä- parate 71
3.1.	Kneipp Mistel-Pflanzensaft ^R und Kneipp Mistel-Dragees ^R 73
3.2.	Viscysat Bürger ^R liquid. 73
3.3.	Plenosol ^R 75
3.4.	Craviscum ^R liquid. 75
3.5.	Tonoplantin ^R liquid. 77
3.6.	Salus Kreislauf-Stärkungs-Kapseln ^R 77
3.7.	Viscolind P ^R Dragees 77
3.8.	Verus ^R liquid. 79
3.9.	Jumistan ^R Kapseln und liquid. 79
<u>IV.</u>	Untersuchung der Flavonoide von Viscum alb. L. . 80
1.	Untersuchung der Droge 80
1.1.	Dünnschichtchromatographie 80
1.2.	HPLC 82
2.	Untersuchung der Frisch- und Gärsäfte 85
3.	Flavonoid-Fingerprintanalyse von Fertigprä- paraten 85
<u>KAPITEL 3:</u>	Dimerisierungsreaktion der Phenylpropan- derivate 89
<u>I.</u>	Reaktionsmechanismus der Dimerisierungs- reaktion 89
<u>II.</u>	Schlußfolgerungen 92

	Seite
KAPITEL 4: Pharmakologische Untersuchungen	94
I. cAMP-Phosphodiesterase-Hemmtest	94
II. Pflanzliche Phenole und Lignane als Hemmstoffe der cAMP-Phosphodiesterase	95
III. Untersuchung der PDE-Hemmung von Viscum album- Extrakten und -Inhaltsstoffen.	98
IV. Nachweis weiterer Verbindungen, die mit einer antihypertonischen Wirkung in Zusammenhang ge- bracht werden können	100
1. Proteine, Aminosäuren	100
2. Cholin und Cholinester	101
3. Amine	103
ZUSAMMENFASSUNG	104
EXPERIMENTELLER TEIL	107
I. Herkunft des Drogenmaterials, der Vergleichs- substanzen und Chemikalien	107
II. Chromatographische Arbeitsmethoden	109
1. Dünnschichtchromatographie	109
1.1. Adsorbentien	109
1.2. Laufmittelsysteme	109
1.3. Detektionsmittel	111
2. Säulenchromatographie	112
3. Präparative Schichtchromatographie	112
4. Gaschromatographie	113
5. Hochleistungsflüssigchromatographie	114
5.1. Apparative Daten	114
5.2. Lösungsmittel	114
5.3. Trennsysteme	114
5.4. Zubereitung der Probelösungen	117
5.4.1. Butanolfraktion der Droge Viscum album	117
5.4.2. Butanolfraktion der Fertigpräparate	118
5.4.3. Probenbereitung aus der Droge für die quan- titative Bestimmung	118

5.4.4.	Probenbereitung aus Tinct. Visci albi für die quantitative Bestimmung	119
5.4.5.	Probenbereitung aus Asgoviscum ^R und Asgoviscum forte ^R liquid. für die quantitative Bestimmung	119
5.4.6.	Probenbereitung aus den Preßsäften für die quantitative Bestimmung	120
5.4.7.	Probenbereitung aus den Gärsäften für die quantitative Bestimmung	120
5.4.8.	Probenbereitung für die Analyse der Flavonoide .	120
5.4.9.	Probenbereitung für die HPLC der Rauwolfia-Alkaloide	121
5.5.	Quantitative Bestimmung der Phenylpropan-derivate	121
5.5.1.	Herstellung der Eichlösungen, Responsefaktoren .	121
5.5.2.	Berechnung	123
<u>III.</u>	Isolierungen und Anreicherungen	123
1.	Substanzen A bis D	123
2.	Extraktion für die Untersuchung der Aminosäuren	124
3.	Extraktbereitung für die Untersuchung der Amine	125
<u>IV.</u>	Spektroskopische und physikalische Methoden . .	126
1.	¹³ C-NMR-Spektroskopie	126
2.	¹ H-NMR-Spektroskopie	126
3.	Massenspektren	126
4.	GC-MS	126
5.	UV-Spektren	127
6.	Schmelzpunkte	127
<u>V.</u>	Chemische Arbeitsmethoden	127
1.	Hydrolysen	127
1.1.	Trifluoressigsäure-Hydrolyse	127
1.2.	Hydrolyse mit Schwefelsäure und Essigsäure . . .	128
1.3.	Partialhydrolyse im Mikromaßstab	128
1.4.	Mikrohydrolyse auf der DC-Platte	128

	Seite
2.	Derivatisierungen 129
2.1.	Acetylierung 129
2.1.1.	Standardmethode 129
2.1.2.	Schnellmethode mit NMID 129
2.2.	Darstellung der partiell methylierten Alditol- acetate 130
2.3.	Proteinbestimmung 131
<u>VI.</u>	Zusammensetzung und Chargennummern der unter- suchten Fertigpräparate (nach Angaben der Hersteller) 131
<u>VII.</u>	Meßdaten 134
1.	Substanz A 134
2.	Substanz B 136
3.	Substanz C 136
4.	Substanz D 136
<u>VIII.</u>	Pharmakologische Untersuchungen - Messung der cAMP-Phosphodiesterase Hemmung 137
L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S 138	

E I N L E I T U N G

Obwohl bisher aus *Viscum album* L. eine Vielzahl von Inhaltsstoffen mit sehr unterschiedlicher Struktur isoliert worden ist, kann bis heute noch nicht angegeben werden, auf welche Substanzen die beschriebene und therapeutisch eingesetzte anti-hypertone Wirkung im einzelnen zurückzuführen ist. Diskutiert werden niedermolekulare Verbindungen wie z. B. Flavonoide, Cholin, Acetylcholin oder biogene Amine. Auch höhermolekulare Strukturen, wie z. B. die Viscotoxine, kommen in Frage. Eine Standardisierung und Wirkwertbestimmung von Mistelpräparaten war aus diesem Grund bisher nicht möglich. Die bei einigen Fertigpräparaten (z. B. Plenisol^R) verwendete biologische Standardisierung (Nekrose an der Kaninchenhaut, Wachstumshemmung von Ascites-Tumorzellen) hat für die Indikation "Hypertonie" keine Relevanz.

Nachdem bei einer orientierenden Untersuchung in der Butanolfraktion der Droge einige bisher nicht bekannte Verbindungen nachgewiesen werden konnten und die Butanolfraktion in cAMP-Phosphodiesterase-Hemmtesten eine stärkere Wirkung als der methanolische Gesamtextrakt zeigte, sollte versucht werden, diese neuen Verbindungen zu isolieren, strukturell aufzuklären und pharmakologisch zu untersuchen. Sofern diese Substanzen für alle Mistelpräparate ein Charakteristikum darstellen, sollte versucht werden, auf der Grundlage dieser neuen Verbindungen zur Standardisierung eine HPLC-Fingerprintanalyse sowie eine quantitative Bestimmungsmethode auszuarbeiten.

ALLGEMEINER TEIL

KAPITEL 1: Viscum album L.

I. Kenntnisstand über Viscum album L.

1. Systematik und Verbreitung

Die Mistel gehört zur Familie der Loranthaceae, die 40 Gattungen umfaßt mit 1300 bis 1400 Arten (1). Die meisten der zu dieser Familie gehörenden Halbparasiten sind in tropischen und subtropischen Ländern beheimatet.

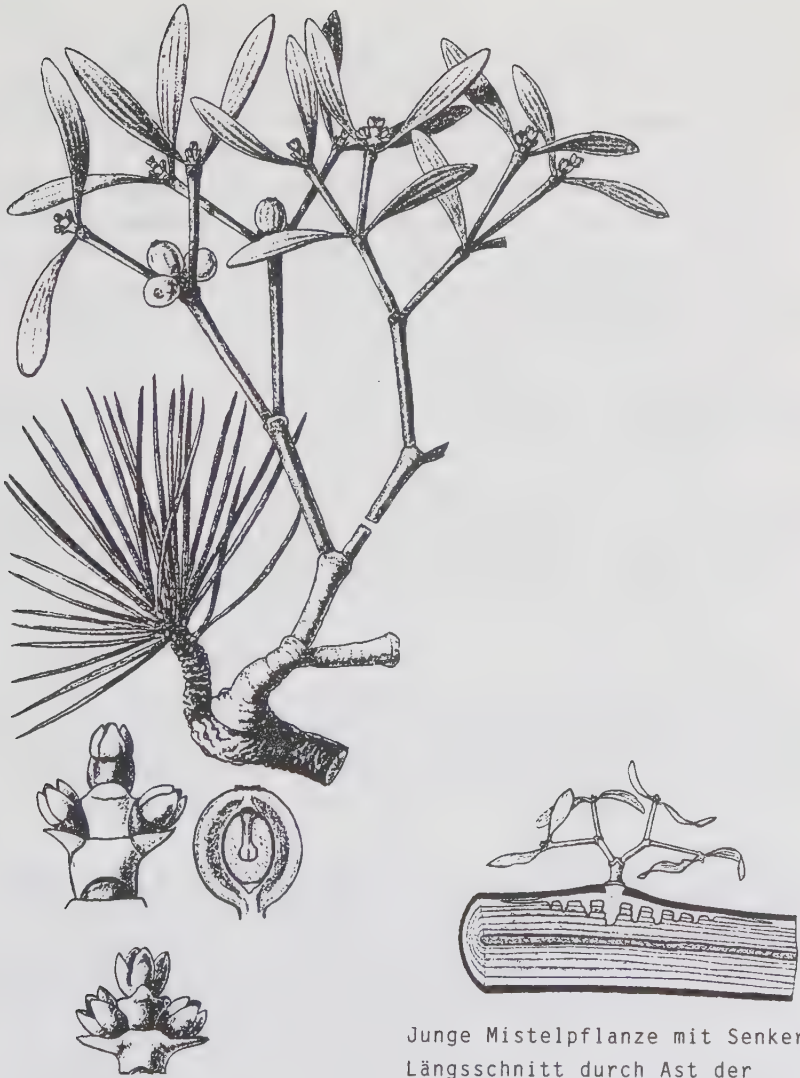
In der Regel werden zwei Unterfamilien unterschieden:

1. Loranthoidae: hierzu gehört z. B. die Gattung
Loranthus mit etwa 500 Arten
2. Viscoidae: hierzu gehören u. a. die Gattungen
Phoradendron, Arceuthobium und Viscum.

In Europa kommen die Gattungen Viscum L., Loranthus L. und Arceuthobium M.B. vor (2). Die Gattung Phoradendron Nutt. ist in Amerika mit etwa 300 Arten verbreitet.

Viscum album L. - Weiße Mistel, Gewöhnliche Mistel, je nach Mundart unter einer Vielzahl von volkstümlichen Bezeichnungen bekannt, z. B. Hexenbesen oder Drudenfuß (2,3) - ist im gesamten gemäßigten Eurasien verbreitet. Dagegen kommt die Riemenmistel (auch Eichenmistel (!) genannt), Loranthus europaeus Jacq. nur im süd- und südöstlichen Europa und Viscum cruciacum (gekreuztblättrige oder rote Mistel) nur im Mediterranraum vor (2).

Früher versuchte man, Viscum album aufgrund morphologischer Merkmale (z. B. Größe der Blätter, Form, Anzahl und Farbe



Junge Mistelpflanze mit Senkern;
Längsschnitt durch Ast der
Wirtspflanze, nach HEGI (2).

Viscum austriacum Wiesb.

Abb. 1: VISCUM ALBUM L.

Habituszeichnung nach Reichenbach, L. und Reichenbach, H.G.: Icones Florae Germaniae et Helvetiae, Band 24, Tafel 140 (1909).

der Scheinbeeren) noch weiter zu unterteilen. Da aber diese stark vom Alter der Mistel und vom Standort etc. abhängig sind und sich auch Misteln des gleichen Wirtes stark unterscheiden können, kommt v. TUBEUF (4) zu folgender Einteilung:

1. **Laubholzmistel**, *Viscum album* var. *mali* (syn. ssp. *album*)

Sie hat das breiteste Wirtsspektrum und kommt nur auf Laubhölzern fast aller einheimischen Arten vor; wenige Laubbäume, z. B. Eiche, meidet sie allerdings.

Die Mistel parasitiert auch auf sich selbst und auf *Loranthus*.

2. **Tannenmistel**, *Viscum album* var. *abietis* (syn. ssp. *abietis*)

Diese Art bewohnt nur *Abies*-Arten, bei uns nur die Weißtanne (*Abies alba* Mill.).

3. **Föhrenmistel**, *Viscum album* var. *pini* (syn. ssp. *austriacum*)

Der Wirt ist hauptsächlich die Föhre (*Pinus sylvestris* L.), manchmal auch die Rottanne (*Picea excelsa* Link).

Die Mistel zählt zu den Halbparasiten und ist selbst zur Assimilation befähigt. Sie durchbricht bei der Keimung mit ihren primären Senkerwurzeln das Periderm des Nährastes und dringt dann in das Rindenparenchym und Xylem ein (Abb. 1).

Organische Substanzen kann die Mistel wie die anderen grünen Pflanzen aufgrund des Chlorophyllgehaltes in Blättern und Zweigen selbst synthetisieren. Sie entzieht ihrem Wirt hauptsächlich Wasser und darin enthaltene Nährsalze. Dabei können auch einige organische Stoffe aufgenommen werden. So wurden in Misteln, die auf *Nerium oleander* gewachsen waren (5), Glykoside des 14,16-Dianhydrogitoxigenins und des Oleandrigenins gefunden. Tropinalkaloide (1), die in einer *Loranthus*-art gefunden wurden, stammen mit ziemlicher Sicherheit ebenfalls von der Wirtspflanze (*Duboisia*-Art).

2. Botanische Beschreibung

Die Mistel ist ein immergrüner, auf Bäumen schmarotzender Strauch mit fast kugelartig gewachsener Form. Sie kann 1 m und mehr im Durchmesser erreichen. Auf einem kurzen, dicken Stamm wachsen die sich dichotom verzweigenden, in den Gelenken leicht abbrechenden Seitentriebe. Die lederigen Laubblätter sitzen gegenständig und haben länglich verkehrteiförmige bis breitzungenförmige Gestalt. Die unscheinbaren Blüten sind eingeschlechtlich (zweihäusig) und sitzen in den Achseln kleiner Hochblätter. Die männlichen sind größer und auffälliger als die weiblichen. Die vier Staubblätter, die mit den Perigonblättern vollständig verwachsen sind, entleeren die Pollen durch Poren an der Innenseite.

Die Blüten werden im Sommer angelegt, blühen im März des folgenden Jahres und werden von Insekten bestäubt. Die Beeren reifen von Herbst bis Jahresende.

Bei den weißen Scheinbeeren ist die Blütenachse an der Fruchtbildung beteiligt. Im Endokarp der Früchte befinden sich die "Samen", die jeweils ein bis drei grünliche Keimlinge enthalten. Weitere Angaben hierzu finden sich bei (2, 3,4,6,7).

3. Historischer Überblick und volksmedizinische Verwendung

Bereits im Altertum und im Mittelalter fand die Mistel in der Heilkunde Verwendung. So benutzte sie HIPPOKRATES (460 bis 377 v. Chr.) als Mittel gegen "Milzsucht" (8).

Nach Berichten von PLINIUS G.P. SECUNDUS (23 bis 79 n. Chr.), der besonders der Eichenmistel Heilwirkung zuschrieb, fand sie Verwendung als Mittel gegen Epilepsie und Schwindel (6). Die gleichen Angaben machten auch PARACELSUS (9), LONI-

CERUS (10) und andere. Sie wurde auch bei asthmatischen Beschwerden und Amenorrhoe angewendet. Die epiphytische, von der Erde getrennte Lebensweise dürfte zu einigen dieser Anwendungen mit beigetragen haben. Bis weit ins 18. und 19. Jahrhundert wurde die Mistel mit diesen Indikationen von Ärzten verwendet.

Die Anschauung, daß die Heilkraft der Mistel je nach Wirt unterschiedlich sei, fand auch in R. STEINERS anthroposophisches Gedankengut Eingang (11). Er weckte besonders das Interesse an Mistelextrakten zur Krebsbehandlung. Hieraus wurde das Injektionspräparat Iscador^R entwickelt (12).

Die cytostatische Wirkung von Mistelpräparationen haben unabhängig voneinander KOCH (13), CHERNOV (14), WINTERFELD (15) und VESTER (16) mit Hilfe von in vivo und in vitro Krebsmodellen nachgewiesen (7).

1881 fand PARK (17) bei einem Kaltwasserauszug der Mistel eine digitalisartige Wirkung. GAULTIER und CHEVALIER (18) fanden 1907 für Mistelauszüge sowohl beim Menschen als auch beim Versuchstier eine blutdrucksenkende Wirkung. Dieser Befund wurde 1927 von BIJLSMA (19) bestätigt. Demnach soll die Mistel einen peripher angreifenden, vorübergehend wirkenden parasympathicomimetischen Wirkstoff enthalten (20). Als Wirksubstanzen wurden Cholin und Cholinester diskutiert. Später wurden weitere in der Pflanze nachgewiesene Verbindungen ebenfalls mit dieser Wirkung in Verbindung gebracht: Histamin (21), γ -Aminobuttersäure (22,23), Phenethylamin (24) und Tyramin (24).

PORA und Mitarb. (25) applizierten Hunden i. v. wäßrige Mistelextrakte und erreichten damit eine Blutdrucksenkung, die allerdings immer von herz- und atmungstoxischen Erscheinungen begleitet war. Bei der oralen Einnahme von Mistelpul-

ver durch Probanden fanden sie dagegen stark blutdrucksenkende Wirkung von lang anhaltender Dauer, die nicht durch die toxischen Effekte gestört war.

Die Homöopathie setzt die Mistel bei Hypertonie, Arteriosklerose, Asthma bronchiale, Epilepsie und Neuralgien ein. Gebräuchlich sind Urtinktur bis Dil. D2 (26,27).

In der Allopathie findet die Mistel Anwendung in drei Hauptindikationsbereichen:

1. als leichtes Kardiakum und Antihypertonikum
2. in der Krebsbehandlung ("palliative Karzinomtherapie") und
3. bei Arthrosen.

In der Roten Liste 1986* (28) sind insgesamt 46 Spezialitäten, darunter 34 Kardiaka und Antihypertonika aufgeführt, die Mistelextrakte enthalten. Die Mistel steht in der Häufigkeit der Anwendung als Kardiakum nach Crataegus an zweiter Stelle. Dies belegt die Bedeutung dieser Pflanze in der Phytotherapie.

* Verzeichnis von Fertigarzneimitteln der Mitglieder des Bundesverbandes der Pharmazeutischen Industrie e. V.

4. Bisher bekannte Inhaltsstoffe

4.1. Hochmolekulare Inhaltsstoffe

Viscotoxine (20,29,30,31,32,33): A2, A3, B; MG ca. 5000 D (B), Gruppe rel. niedermolekularer basischer Proteine mit hoher parenteraler Toxizität. Subletale Dosen sollen Hypotension, Bradykardie und negativ inotropen Effekt am Herzen ausüben (20).

Basische Proteine (34,35,112): MG 14000 bis 125000 D, Proteinkomplexe mit histonähnlichem Charakter, die sehr leicht denaturierbar sind. Sie bewirken eine starke Hemmung des Tumorwachstums nur im nativen Zustand (34), außerdem Thymusstimulation (35).

Lektine (20,36,37,38): ML I, ML II, ML III; Glykoproteine mit Bindungsspezifität für Zucker, cytotoxische Wirkung (37,71).

Polysaccharide (7,39,40,41):

Angaben über Isolierung und Strukturaufklärung von Galacturonanen und Arabinogalactanen aus Stengeln und Blättern bzw. Beeren finden sich in der Arbeit von JORDAN (7).

4.2. Niedermolekulare Inhaltsstoffe

Flavonoide:

Erstmals wiesen SCHINDLER (42) und TRONCHET (43) in *Viscum album* Flavonoide nach. BECKER und EXNER (44, 45,46) konnten folgende Flavonoid-Aglyka identifizieren:

Quercetin

3-0-Methylether des Quercetins

7-0-Methylether des Quercetins = Rhamnetin

3'-0-Methylether des Quercetins = Isorhamnetin

3,3'-0-Dimethylether des Quercetins

3,7-0-Dimethylether des Quercetins

7,3'-0-Dimethylether des Quercetins = Rhamnazin

3,7,3'-0-Trimethylether des Quercetins

2'-Hydroxy-4',6'-dimethoxychalcon-4-glucosid (47)

Aus *Loranthus europaeus* L. (Riemenmistel) (48):

Rhamnocitrin-3-0-rhamnosid

Rhamnetin-3-0-glucosid

Rhamnetin-3-0-rhamnosid

Aus nichteuropäischen Mistelarten konnten bisher folgende flavonoide Verbindungen isoliert und identifiziert werden:

- *Viscum album* var. *coloratum* (Japan) (49):

Flavoyadorinin A: 7,3'-Di-0-methylquercetin(rhamnazin)-3-0-glucosid

Flavoyadorinin B: 7,3'-Di-0-methyluteolin-4'-0-mono-glucosid

Homoflavoyadorinin B: 7,3'-Di-0-methyluteolin-4'-0-glucoapiosid

- *Psittacanthus cuneifolius* (Argentinische Mistel) (50):

Quercetin-3-0-rhamnosid : Quercitrin

Quercetin-3-0-xylosid : Reynoutrin

Quercetin-3-0- α -arabinofuranosid: Avicularin
(+)-Catechin

- *Loranthus paraciticus* (Chinesische Mistel) (51):

Quercetin

Quercetin-3-0-arabinosid

- Phoradendron tomentosum (Texanische Mistelart) (52):
 - Vitexin
 - 6-C-Glucosyl-8-C-arabinosylapigenin = Schaftosid
 - 6-C-Arabinosyl-8-C-glucosylapigenin = Isoschaftosid
 - Apigenin-4'-O-glucosid
 - Apigenin

Pflanzensäuren:

Kaffeesäure	(24,44,46,53)
Sinapinsäure	(24,44,46)
Syringasäure	(24)
p-Cumarsäure	(24)
Protocatechusäure	(24)
Vanillinsäure	(24,44,46)
Ferulasäure	(24,53)
p-Hydroxybenzoesäure	(24)
p-Hydroxyphenylelessigsäure	(24)
Chinasäure	(24)
Shikimisäure	(24)
Anissäure	(44,46)
Chlorogensäure	(53)
Salicylsäure	(24)
Gentisinsäure	(44,46)

flüchtige Fettsäuren: Essig-, Propion-, Butter-,
Valeriansäure u. a. (54)

Palmitinsäure	(24)
Ölsäure	(24)
Linolsäure	(24)

Aminosäuren (55,57):

Hoher Anteil an freien, nicht proteingebundenen Aminosäuren, wobei Arginin, Asparaginsäure und Prolin in auffallend hohem Prozentsatz enthalten sind. Einige Aminosäuren (z. B. Cystein, Cystin, Tryptophan, Glutamin, Asparagin und Histidin) fehlen.

Ferner wurden methylierte Lysine (56) und *p*-Aminobuttersäure (22,23) nachgewiesen.

Amine:

Cholin (24,58,59,60), Acetylcholin (24,59), Propionylcholin (24), Histamin (21,24), β -Phenylethylamin (24), Tyramin (24).

Zucker, Zuckeralkohole, Alkohole:

Fructose (41), Glucose (41), Saccharose (41), Raffinose (41), D-Mannitol (41), D-Dulcitol (41), D-Xylitol (41), m-Inositol (41), DL-Inositol (41), D-Pinitol (41), L-Quebrachitol (41), D-Quercitol (41), Vitamin C (63,69)

Im Beerenschleim wurde Galacturonsäure, Galactose, Arabinose, Xylose und Rhamnose nachgewiesen (41).

Triterpene:

β -Amyrin (61), Lupeol (62)

Phenylpropanderivate, Lignane:

Syringin (64,65*)
Syringaresinol (66*)

Diversa:

Lignin (67,68).

Alkaloide, Herzglykoside etc., die in einigen Fällen gefunden wurden (1,5,69), entstammen den Wirtsbäumen und sind nicht als eigentliche Inhaltsstoffe der Mittel zu werten.

Saponine (70).

* *Viscum album*, var. *coloratum*

II. Bisherige Versuche zur Identifizierung bzw. Charakterisierung von Mistel-Extrakten

Da der Anteil an freien Aminosäuren in der Mistel und in Mistelextrakten relativ hoch ist und durch das Fehlen einiger, für viele andere Pflanzenextrakte typische Aminosäuren gekennzeichnet ist (Punkt 4.2.), haben WAGNER und Mitarb. (57) den Aminosäurefingerprint zur Identitätsprüfung herangezogen.

Da der Nachweis eines Mistelextraktes in Gemischen mit anderen Drogen, die ebenfalls freie Aminosäuren enthalten, nahezu unmöglich ist und eine quantitative Analyse keinen Rückschluß auf die Wirkqualität des eingesetzten Mistelextraktes zuläßt, konnte es sich hierbei nur um eine approximative Methode handeln.

Andere Methoden zur Charakterisierung und Standardisierung von Mistelsäften auf der Basis höhermolekularer Verbindungen (Lektine und Viscotoxine) haben kürzlich JORDAN (7,174) und HOFSTETTER (71) entwickelt. Da nicht sicher ist, inwieweit diese Proteine in alkoholisch-wäßrige Extrakte, wie sie für alle Präparate zur Herz- und Kreislauftherapie verwendet werden, übergehen, sind auch diese Methoden nur auf bestimmte Fertigpräparate anwendbar. Sie sind außerdem in der Durchführung relativ aufwendig.

Dieser Mangel an geeigneten, schnell durchführbaren Methoden war Anlaß für die folgenden Untersuchungen.

III. Dünnschichtchromatographie der Drogenextrakte und Nachweis bisher nicht beschriebener, neuer Verbindungen

Zu einer ersten orientierenden Untersuchung stellten wir aus der Droge einen methanolischen Extrakt her und chromatographierten diesen im polaren Laufmittelsystem CHCl_3 - MeOH - H_2O (70:30:4) (DC-T1). Die Detektion erfolgte mit Chlorsulfonsäure-Reagens (DC-D1) (72). Detektierbar waren zwei Hauptzonen (A,B), die in R_f -Wert und Detektionsverhalten identisch mit den Glykosiden waren, die PETRIČIĆ und Mitarb. bereits früher in kleiner Menge isolieren, aber nicht identifizieren konnten (73).

Über Fraktionierung des Gesamt-Methanolextraktes durch Ausschüttelung mit Petrolether, Dichlormethan, Ethylacetat und n-Butanol (wassergesättigt) gelang es, die beiden Hauptverbindungen A und B in der Butanol-Fraktion anzureichern. Auch im wäßrigen Rest waren sie noch zum Teil enthalten. Die Chromatogramme der verschiedenen Fraktionen zeigt Abb. 2:

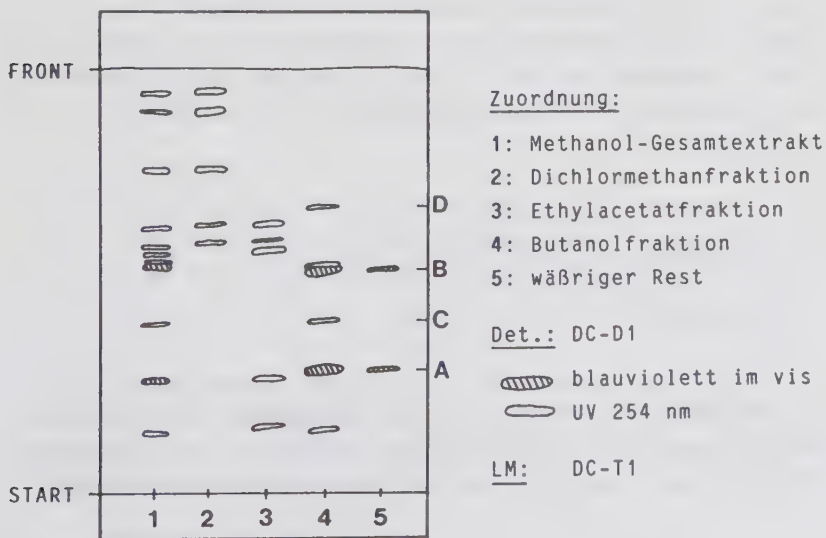


Abb. 2: Dünnschichtchromatogramm der verschiedenen Fraktionen

Als Detektionsmittel erwies sich das Chlorsulfonsäure-Reagens als am besten geeignet. Nach Besprühen mit einer Mischung aus Eisessig - Chlorsulfonsäure (2:1) und anschließendem gelinden Erwärmen mit einem Fön wurden die Substanzen A und B im vis als blauviolette Zonen erkennbar. Sie fluoreszierten bei geringer Auftragemenge und wenn sie nicht durch andere Zonen überlagert waren unter UV 366 nm rot.

In der BuOH-Fraktion fielen noch zwei Zonen C und D auf, die sich mit dem Chlorsulfonsäurereagens im vis nur schwach anfärben ließen, im UV 365 nm tief dunkelviolett fluoreszierten.

Substanzen A und B waren in allen untersuchten Mistelproben die typischen Hauptzonen.

Für die Zwecke der nachfolgenden Isolierung wurde versucht, das Laufmittel DC-T1 durch eines anderer Selektivität zu ersetzen, da die Abtrennung von Substanz B wegen dicht benachbart liegender Zonen zu teilweiser Überlappung führte. Tabelle 22 (siehe Exp. Teil) gibt die R_f-Werte der Substanzen A und B in verschiedenen Laufmittelsystemen (DC-T1 bis T5) wieder. Eine schärfere Abtrennung von Substanz B konnte nur durch Verwendung von HPTLC-Fertigplatten erreicht werden, so daß Laufmittel DC-T1 als Standardlaufmittel weiterhin verwendet wurde.

IV. Isolierung und Strukturaufklärung

1. Isolierung

Die gepulverte Droge wurde zunächst zur Entfernung von lipophilen Begleitstoffen mit Petrolether am Soxhlet extrahiert. Anschließend gewannen wir in gleicher Weise einen Methanol-Extrakt. Nach Ausschüttelung mit Lösungsmitteln steigender

Polarität (CHCl_2 , EtOAc , BuOH) erhielten wir die Substanzen A und B in der Butanolfraction konzentriert.

1.1. Säulenchromatographie

Aus dieser BuOH -Fraktion reicherten wir durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit CHCl_2 - MeOH - H_2O (70:30:4) als Laufmittel (DC-T1) die Substanzen weiter an. Wir erhielten dabei folgende Ausbeuten:

Fraktion K2:	200 mg (enthält Substanz B)
Fraktion K4:	70 mg (enthält Substanz A)

1.2. Präparative Dünnschichtchromatographie

Da in beiden Fraktionen neben Substanz A und B noch deutliche Nebenzonen (bei Substanz B z. B. eine zweite mit Chlorsulfonsäure-Reagens blau reagierende Zone sowie eine mit gelber Farbe überlagernde weitere Zone) nachweisbar waren, unterzogen wir Fraktion K2 und K4 der präparativen Dünnschichtchromatographie. Als stationäre Phase dienten handelsübliche Kieselgelplatten (Merck) mit 0,5 mm Schichtdicke. Die mobile Phase war identisch zur Säulenchromatographie (DC-T1).

Da sich die beiden sehr polaren Verbindungen nur schwer wieder vom Kieselgel eluieren ließen, waren die Ausbeuten nur gering. Zur Elution verwendeten wir die Mischung aus CH_2Cl_2 - MeOH (1:1). Um Verunreinigungen der Substanzen mit Plattenkleber zu vermeiden, wurden die DC-Platten vor Gebrauch zweimal mit MeOH - H_2O (80:20) leer entwickelt.

Die mehrmalige Wiederholung der Säulenchromatographie und präparativen DC lieferte 20 mg Substanz A und 15 mg Substanz B in reiner Form.

2. Strukturaufklärung der Substanz A

2.1. Massenspektren

Aufgrund der hohen Polarität der Substanzen A und B (Rf-Wert von 0,3 bzw. 0,5 im polaren Laufmittelsystem DC-T1) sollte es sich um glykosidische Verbindungen handeln.

PETRIČIĆ (73) hatte in beiden Verbindungen Glucose und ein gemeinsames Aglykon nachgewiesen, ohne daß es ihm gelungen war, dieses zu charakterisieren. Er kam zu dem Schluß, daß die Verbindung A mit dem niedrigeren Rf-Wert ein Mol Glucose mehr enthalten müsse, was sich später durch unsere Untersuchungen als unrichtig erwies.

Da uns anfangs noch kein FAB/MS zur Verfügung stand, stellten wir von Substanz A die Permethy- (PM-) und Peracetyl- (PA-) Verbindung her (siehe Exp. Teil) und nahmen die EI/MS auf. Die entsprechende Fragmentierung beider Derivate ist in Tab. 1 wiedergegeben.

Aus beiden Massenspektren ließ sich einwandfrei ableiten, daß im Glykosid außer einer Glucose noch eine Pentose enthalten sein mußte (74,75). Beide Zucker sind miteinander als Biosid verknüpft, was an den Fragmenten m/z 547 bzw. m/z 379 erkennbar war. Über die Reihenfolge und Art der Verknüpfung der Zucker an das Aglykon ließ sich mit diesen Massenspektren noch keine Aussage machen, da in den beiden Spektren ein entsprechendes Bruchstück nach Abspaltung eines Zuckers nicht in Erscheinung trat.

Da das Fragment für das Aglykon der PA-Substanz (m/z 252) um m/z 28 höher lag als das Aglykon-Fragment der PM-Substanz (m/z 224), konnten wir auf das Vorliegen einer freien Hydroxylgruppe schließen und für das Aglykon ein Molekulargewicht von 210

Fragmentierung der permethylierten Substanz A		Fragmentierung der peracetylierten Substanz A	
Peak m/z	Zuordnung	Peak m/z	Zuordnung
620	M ⁺ , + H ₂ O	252	Aglykon ⁺ , +H
379	Hexosyl - Pentosyl, -H	209	Aglykon, -Ac. +H
347	Hexosyl - Pentosyl, -32	194	Aglykon, -Ac. -Me +H
224	Aglykon, +H	331	Hexosyl
187	Hexosyl	289	" -42
175	Pentosyl, +H	271	" -60
155	Hexosyl	229	" -42, -60
143	Pentosyl	169	" -42, -60, -60
129	Pentosyl	127	" -42, -60, -60, -42
111	Hexosyl/Pentosyl	109	" -42, -60, -60, -60
101	Pentosyl	259	Pentosyl
		217	" -42
		157	" -42, -60
		139	" -60, -60
		115	" -42, -60, -42
		97	" -42, -60, -60
		547	Hexosyl - Pentosyl

Tab. 1: MS-Fragmentierung der Substanz A (PM- und PA-Derivat)

berechnen. Dies trifft z. B. für ein Phenylpropanolderivat, den Sinapinalkohol, zu. Das Vorliegen einer aliphatischen Doppelbindung konnten wir durch Reduktion mit Bromwasser und KMnO_4 -Lösung bestätigen.

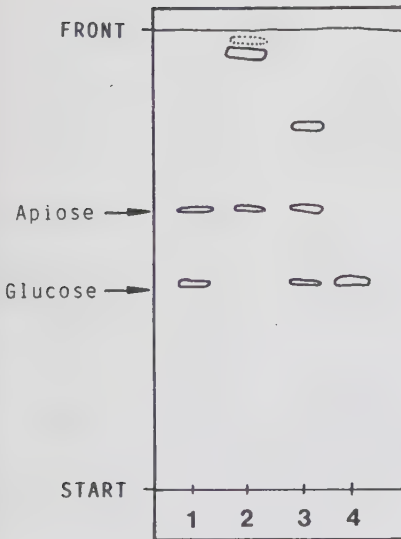
2.2. Hydrolyse und Identifizierung der Zucker

Erste Hydrolyseversuche mit 2N Trifluoressigsäure und zwei-stündigem Erhitzen auf 100 °C ließen nach anschließender DC und Detektion mit Anilin-Diphenylamin-Reagens (DC-D4) (76,77) eine sich bläulich anfärbende Zone in Höhe der Glucose erkennen. Eine zweite Zone, die einer Pentose entsprechen und deshalb im R_f höher liegen sollte, konnten wir nicht feststellen. Deshalb variierten wir die Hydrolysebedingungen. Nach 2 1/2-stündigem Erhitzen mit 5 %iger H_2SO_4 oder 5 %iger Essigsäure erhielten wir im vis eine zweite Zone, die sich im Pentosebereich mit dem Zuckerreagens leicht gelb anfärben ließ, unter UV 360 nm aber hellgelb fluoreszierte. Durch Co-Chromatographie konnten wir alle häufiger vorkommenden Pentosen (Arabinose, Xylose, Fucose, Ribose sowie Desoxyzucker) nach R_f -Wert oder Detektionsverhalten ausschließen. Der Hinweis, daß es sich um Apiose handeln könnte, kam von dem ungewöhnlichen Anfärbeverhalten.

Ein unter gleichen Bedingungen hergestelltes Hydrolysat von Apiin, einem Apiosylglucosid des Apigenins, lieferte zwei Flecke, einen in Höhe von Glucose ($R_f = 0,45$) und eine zweite gelb fluoreszierende Zone bei $R_f = 0,6$, so daß das Vorliegen einer Apiose sehr wahrscheinlich war. Zur Bestätigung chromatographierten wir ein Hydrolysat von Frangulin B, einem Emodin-6-O-apiosid, in dem die Apiose direkt ans Aglykon gebunden ist. Auch hier trat die gleiche gelbe Zone wieder auf, die auch OHTA (49) bei der Hydrolyse von Homoflavoyadorinin B, einem Apiose enthaltenden Flavonglykosid aus einer japanischen Mistelart, gefunden hatte. Das entsprechende Dünnschichtchromatogramm zeigt Abb. 3.

Apiose ist eine in Glykosiden relativ selten vorkommende, verzweigt-kettige Pentose. Sie wurde bisher als Bestandteil von Zellwandmaterial oder von phenolischen Glykosiden (Tab. 2) gefunden. Auffallend ist das gehäufte Auftreten in Form des Disaccharides Apiobiose mit 1 $\rightarrow$ 2-verknüpfter Glucose.

Über den Nachweis der Apiose in hydrolysierten Extrakten wird in einigen Arbeiten berichtet (87,88,89). Die Chemie und Biosynthese ist in (98,99,113,114) beschrieben.



Zuordnung:

- 1: Substanz A, nach Hydrolyse
- 2: Frangulin B, " "
- 3: Apiin, " "
- 4: Glucose-Test

Det.: DC-D4

LM: DC-T7

Abb. 3: Hydrolyseprodukte von Substanz A, Apiin und Frangulin B

Verbindung	Aglykon	Stammpflanze	Zuckerverknüpfung	Lit.
Apin	Flavon	Petroselinum crispum (Mill.) Nym ex hort. Kew	1->2-Verknüpfung	(78,79)
Homoflavoyadorinin B	Flavon	Viscum album L., var. colorat.		(49)
Glucofrangulin B	Anthrachinon	Rhamnus frangula L.	direkt an Aglykon geb.	(80)
Frangulin B	Anthrachinon	Rhamnus frangula L.	direkt an Aglykon geb.	(80)
Graveobiosid A	Flavon	Apium graveolens L.	1->2-Verknüpfung	(90)
Graveobiosid B	Flavon	Luffa echinata Roxb.	1->2-Verknüpfung	(81)
Lanceolarin	Isoflavon	Dalbergia lanceolaria L.	1->2-Verknüpfung	(82)
Kämpferol-3- β -glucoapiosid	Flavonol	Cicer arietinum L.	1->2-Verknüpfung	(83)
Tuberkulatin	Lignan	Haplophyllum tuberculatum L.	direkt an Aglykon geb.	(84)
Apiofuranosylebulosid	Iridoid	Sambucus ebulus L.	1->6-Verknüpfung	(85)
Furcatin	p-Vinylphenol	Viburnum furcatum Blume	1->6-Verknüpfung	(86)
Gentisinsäureapiosyl- glucosid	Phenolcarbon- säure	Mimosa pudica L.	1->2-Verknüpfung	(176)

Tab. 2: Vorkommen von Apiose in glykosidisch gebundener Form

2.3. Methylierungsanalyse

Von den zur Permethylierung von Polysacchariden und Glykosiden üblichen Methoden (74,76,91,92,93) verwendeten wir das Verfahren nach HAKOMORI (93). Die Substanz wurde in Dimethylsulfoxid mit Natrium-sulfinmethanid und Methyljodid umgesetzt. Nach Hydrolyse reduzierten wir die freien, partiell methylierten Monosaccharide mit NaBD₄, um die C-1-Atome zu kennzeichnen (94). Die gebildeten partiell methylierten Alditolacetate wurden durch GC/MS-Analyse identifiziert.

Säule	2,3,3'-Tri-0-methyl- 1,4-di-0-acetylpentitol-d ₁	3,4,6-Tri-0-methyl- 1,2,5-tri-0-acetyl-hexitol-d ₁ oder: 2,4,6-Tri-0-methyl- 1,3,5-tri-0-acetyl-hexitol-d ₁
A	0,49	1,82
B	0,61	1,64

Relative Retentionszeiten bezogen auf 2,3,4,6-tetramethyl-1,5-di-0-acetylhexitol als Standard.

Tab. 3: Relative Retentionszeiten der partiell methylierten Alditolacetate;

Säule A: OV-225 Glassäule, 170 °C, isotherm

Säule B: OV-225 FS Kapillarsäule, 150 - 210 °C, 5°/min

siehe auch Exp. Teil

Der Peak bei RRT = 1,82 (Säule A) könnte nach Literaturvergleich entweder von einem 3,4,6-Tri-O-methyl-1,2,5-tri-O-acetyl-hexitol oder von einem 2,4,6-Tri-O-methyl-1,3,5-tri-O-acetyl-hexitol stammen und damit einer 1 $\rightarrow$ 2- oder einer 1 $\rightarrow$ 3-verknüpften Glucose entsprechen (94). Im Falle einer 1 $\rightarrow$ 3-Verknüpfung sollte das Fragment m/z 118, das von dem endständigen, substituierten C1-C2-Bruchstück stammt, deutlich erscheinen. Dagegen beweisen die intensiven Signale von m/z 190 / 130 und m/z 161 / 129 eindeutig eine Substitution am C2 der Glucose, da die Spaltung der Kohlenstoffkette am leichtesten zwischen zwei Methylsubstituenten erfolgt, in diesem Fall zwischen C3 und C4 (siehe Abb. 4). Das gleichzeitige Auftreten der Fragmente m/z 129 und m/z 130 sowie das Fragment m/z 190 kommt durch die Deuterierung am C1 zustande. Die Intensitäten der Signale stimmen mit den in der Literatur angegebenen Werten überein.

Das gleichzeitige Auftreten der Fragmente m/z 234 und m/z 206 im MS des Pentosederivates (siehe Abb. 5) kann nur von einer verzweigten Kette, wie sie in der Apiose vorliegt, stammen. Die Methylierung der C2-, C3- und C3'-OH-Gruppe, die sich aus den Signalen m/z 118 und m/z 161 sowie aus dem im Vergleich zu m/z 234 intensitätsschwächeren Signal m/z 206 ergibt, zeigt, daß die Apiose endständig gebunden sein mußte und damit der Fragmentierung des Apiosederivates aus Frangulin B entspricht (80).

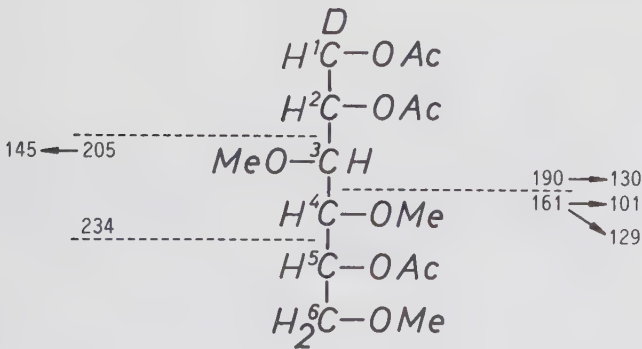
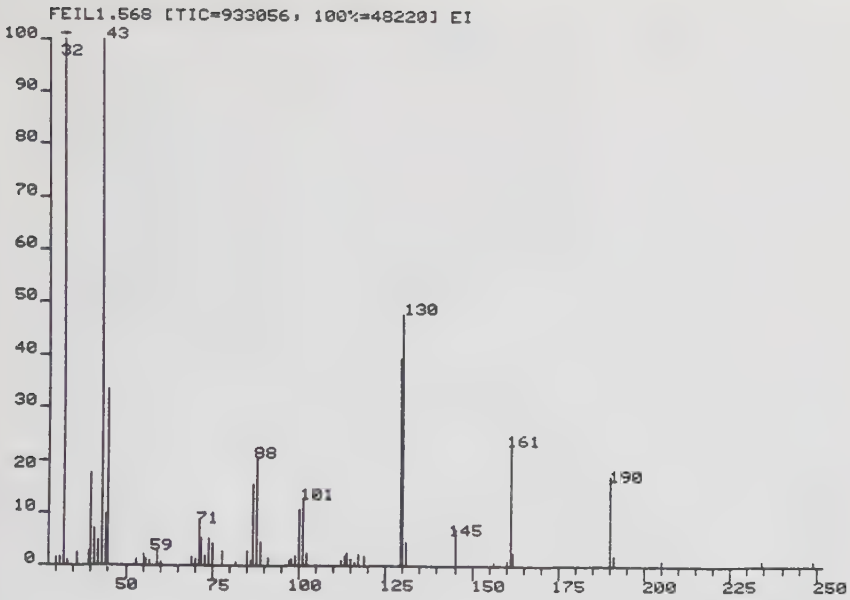


Abb. 4: MS und Fragmentierung des partiell methylierten Alditolacetates der 1→2-verknüpften Glucose

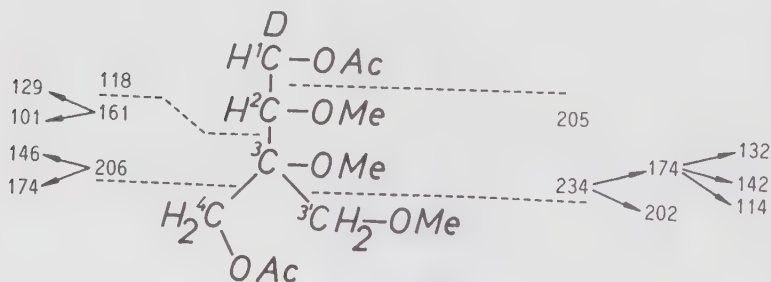
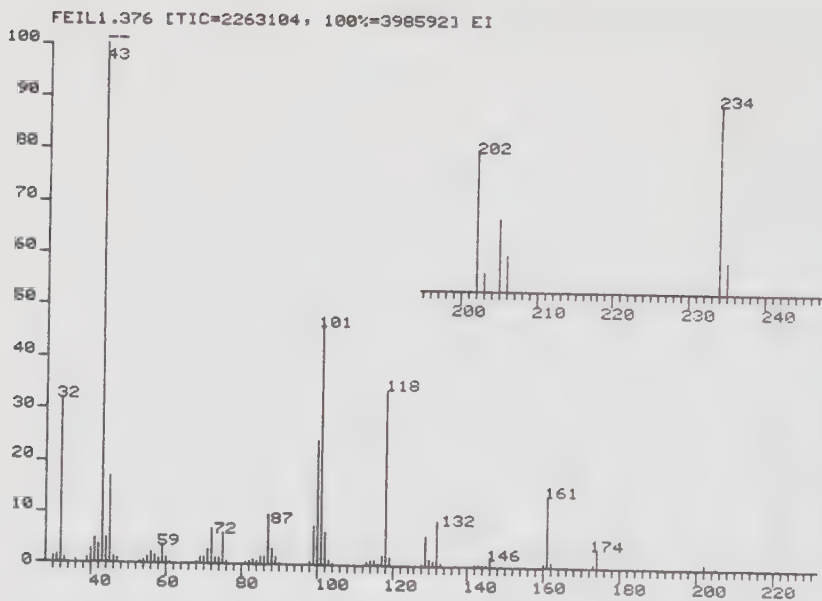


Abb. 5: MS und Fragmentierung des partiell methylierten Alditolacetates der endständigen Apiose

2.4. ^1H -NMR-Spektroskopie

Zur eindeutigen Klärung der Aglykonstruktur wurden von Substanz A ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren aufgenommen. Das Protonenresonanzspektrum ließ zwei aromatische Protonen, zwei Methoxy-Gruppen, zwei vinyloge Protonen und zwei durch eine Sauerstoff-Funktion ins tiefere Feld verschobene Protonen erkennen. Diese Daten sprechen für das Vorliegen eines 4-Hydroxy-3,5-dimethoxyzimtalkohol-Derivates und stimmen, wie aus Tab. 4 hervorgeht, mit denen des Eleutherosid B aus *Acanthopanax senticosus* (95) überein.

Die angegebenen Verschiebungen stehen in Einklang mit den Ergebnissen von OVODOV (96) und EGLOFF (97).

Zuordnung		Eleutherosid B	Substanz A δ (ppm)
C-10,11	-O-CH ₃	3,76 s	3,80
C-9	H ₂	4,13 d	4,13 d _{br}
C-1'	H, Glu	4,85 - 5,0 m	4,90 d _{br}
C-1''	H, Apio	---	5,37 s _{br}
C-7,8	H	6,31 - 6,4 m	6,30 - 6,65 m
C-2,6	H	6,74 s	6,73 s

Tab. 4: ^1H -NMR-Verschiebungen von Eleutherosid B und Substanz A

2.5. ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Die Signale des Sinapinalkohols lassen sich im ^{13}C -NMR-Spektrum der peracetylierten Substanz (Tab. 5) einwandfrei zuordnen (68,85,97). Typisch für das C-3'' der verzweigt-kettigen Apiose ist das Signal bei 84,31 ppm (85). Bei den Zuckern konnten wir nur die Verschiebungen der -CH₂OAc- Gruppen (C-6',4'') sowie das anomere C-1' der Glucose zuordnen. Das

C-1'' der Apiose dürfte im Signal von C-2/6 (103,98 ppm) mit enthalten sein. Die restlichen C-Atome der Zucker, die Verschiebungen zwischen 69 und 78 ppm geben, wurden nicht zugeordnet.

C	δ (ppm)	C	δ (ppm)	C	δ (ppm)
1	130,9	6	103,98	1'	105,71
2	103,98	7	133,96	6'	62,28
3	153,31	8	123,14	1''	103,99
4	133,0	9	64,87	3''	84,31
5	153,31	10/11	56,20	3'''	63,52

Tab. 5: Zuordnung der ^{13}C -NMR-Verschiebungen der peracetylierten Substanz A.

Somit stellt Substanz A ein Syringenin-4-O- β -D-apiofuranosyl-1 $\rightarrow$ 2- β -D-glucopyranosid dar (Abb. 6). Ein Apiobiosid dieses Strukturtyps ist bisher nicht isoliert worden.

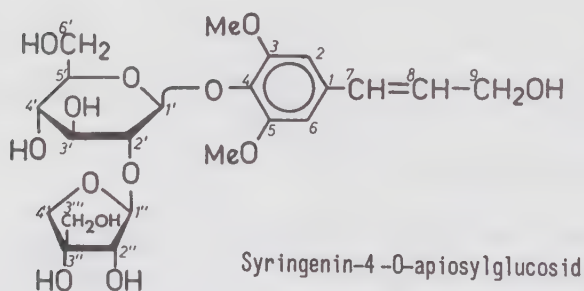


Abb. 6: Strukturformel von Substanz A

3. Strukturaufklärung der Substanz B

Substanz B zeigte das gleiche Detektionsverhalten wie Substanz A, erschien aber im LM DC-T1 bei einem etwas höheren Rf-Wert (0,5). Die gleiche Substanz erhielten wir aus Substanz A nach ca. 30-minütiger Hydrolyse mit verdünnter Säure (z. B. 5 %ige Essigsäure) bei Raumtemperatur. Damit stand fest, daß es sich wiederum um ein Sinapinalkoholglykosid handelte. Im Hydrolysat von Substanz B (0,5N TFA, 2 1/2-stündiges Erhitzen auf 100 °C) ließ sich über DC nur Glucose nachweisen (vgl. Kap. 2.2.).

Im **Massenspektrum** der peracetylierten Verbindung fanden wir die typischen Fragmente einer Hexose (siehe Tab. 6, vgl. Tab. 1 von Substanz A).

Das Aglykon zeigte Signale bei m/z 252, 209 und 193, der Massenpeak bei 582 entsprach dem errechneten Wert des Monoglucosids.

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der peracetylierten Substanz B zeigten sich die Verschiebungen der Protonen des Sinapinalkohols bei den erwarteten ppm-Werten (Tab. 7). Eine Kopplungskonstante von 15,8 Hz zwischen H-7 und H-8 deutete auf eine trans-Anordnung der Doppelbindung in der Seitenkette. Die Protonen des Zuckeranteils mit Verschiebungen zwischen 5 bis 5,5 ppm konnten aufgrund der geringen Auflösung nicht einzeln zugeordnet werden.

Substanz B ist das 4-O-B-D-Glucosid des Sinapinalkohols und damit Syringin.

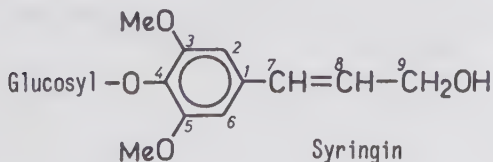


Abb. 7: Strukturformel von Substanz B

Peak m/z	Zuordnung
582	M ⁺
523	M ⁺ , -OAc
252	Aglucon ⁺ , +H
209	Aglucon ⁺ , -Ac. +H
193	Aglucon ⁺ , -OAc.
331	Glucosyl ⁺
289	" -42
271	" -60
229	" -42, -60
211	" -60, -60
187	" -42, -42, -60
169	" -42, -60, -60
145	" -42, -42, -42, -60
127	" -42, -60, -60, -42
109	" -42, -60, -60, -60

Tab. 6: Massenspektrum der peracetylierten Substanz B

Zuordnung	ppm	
H-2/6	6,55	Singulett
H-7	6,53	Dublett, J = 15,6 Hz mit H-8
H-8	6,13	Dublett-Triplett, J = 15,6 Hz mit H-7 J = 5,8 Hz mit H-9
H-9	4,69	Dublett, J = 5,8 Hz mit H-8
-O-CH ₃	3,81	Singulett
Zucker-H	5-5,5	Multiplett

Tab. 7: ¹H-NMR-Verschiebungen von Substanz B (peracetyliert)

Das Vorkommen geringer Mengen Syringin wurde bereits früher von PLOUVIER (64) in *Viscum album* und von OKUMURA (65) in einer aus Japan stammenden Mistel (*Viscum album*, var. *coloratum*) beschrieben. Syringin kommt ebenfalls in einigen Arten der Oleaceen-Familie (*Syringa*, *Fraxinus*) (100-103) und *Salix*-Arten (97) vor. Außerdem wurde es in *Acanthopanax* (*Eleutherococcus*) *senticosus* als Eleutherosid B identifiziert.

Die DC-Analyse eines von uns hergestellten methanolischen Rindenextraktes aus *Syringa vulgaris* ergab somit auch in Höhe des "Mistel-Syringins" eine deutlich erkennbare Zone mit identischem Detektionsverhalten.

Der Sinapinalkohol wird in den Pflanzen zum Aufbau des Laubholzlignins benötigt, wobei Mischpolymerisate aus Syringyl- und Guajacyl-Einheiten entstehen. Das Coniferenlignin dagegen besteht nur aus Guajacyl-Einheiten. Syringin kann als Speicherform für die Ligninbildung angesehen werden (105,109-111).

NIMZ und Mitarb. (68) konnten u. a. mit ^{13}C -Kernresonanzspektren beweisen, daß auch die auf Nadelholz gewachsenen Misteln neben Guajacylpropan- noch Syringylpropaneinheiten als Ligninbausteine und somit ein für Laubhölzer typisches Lignin besitzen. Dies spricht ebenfalls dafür, daß die Mistel einen vom Wirt unabhängigen Stoffwechsel hat.

Den Sinapinalkohol konnten wir nach Mikro-Hydrolyse von Syringin mit 2N-TFA nicht nachweisen. Die über HPLC verfolgte Umsetzung ließ nur eine Abnahme der Menge an Syringin erkennen. Weitere Signale von Umsetzungsprodukten waren nicht erkennbar. Das gleiche Verhalten zeigte Coniferylalkohol: nach Zugabe einiger Tropfen 2N-TFA zur verdünnten Lösung und einstündigem Erhitzen auf 65 °C erschienen weder der Alkohol, noch Umsetzungsprodukte im HPLC-Chromatogramm. Vermutlich haben sich Polymerprodukte gebildet, die sich nicht von der RP-18-Phase eluieren ließen. Den freien Sinapinalkohol konnten wir folglich auch nicht in Mistelextrakten nachweisen.

4. Identifizierung von Substanz C

In der DC-Analyse der Butanolfraktion ließen sich noch zwei mit Chlorsulfonsäure-Reagens schwach reagierende Zonen nachweisen (s. S. 13). Die untere Zone (C) zeigte identisches Verhalten mit dem Eleutherosid E (Syringaresinoldiglucosid), das von HEUR (95) aus *Acanthopanax* (*Eleutherococcus*) *senticosus* isoliert worden war. Nach Anfärben mit konz. Schwefelsäure (DC-D3) und 10-minütigem Erhitzen auf 105 °C konnten wir im vis kräftigere, aber einheitlich dunkelbraune Zonen erhalten.

Die Identität mit Eleutherosid E wurde auch mit Hilfe der HPLC (siehe Kap. 2) sowohl durch Vergleich der Retentionszeiten als auch durch Überspritzen mit der authentischen Vergleichssubstanz sichergestellt. Die on-line mit dem Photodiodenarray aufgenommenen UV-Spektren (siehe Kap. 2, II. 4.) des Peaks des Drogenchromatogramms und der Referenzsubstanz konnten durch Aufeinanderlegen vollständig zur Deckung gebracht werden (s. Abb. 11). Durch Isolierung einer kleinen Menge der Zone C über präparative DC bestätigten wir das Ergebnis.

Damit liegt in Substanz C die Dimerverbindung von Syringin, das (+)-Syringaresinol-4',4''-O-β-D-diglucopyranosid vor, das zur Verbindungsklasse der Lignane gehört. Die Strukturformel zeigt Abb. 8.

Der Definition nach sind Lignane Dimerverbindungen von Phenylpropaneinheiten (C₆-C₃), die durch das Zentralatom der Seitenkette verknüpft sind (C8-C8'-Bindung). Liegt eine andere Art der Verknüpfung vor, werden die Verbindungen als Neolignane bezeichnet (106).

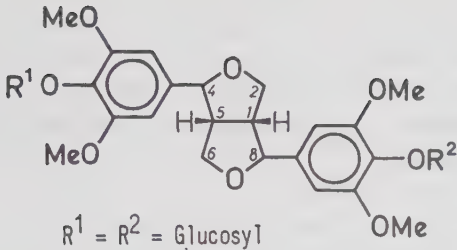


Abb. 8: Strukturformel von (+)-Syringaresinoldiglucosid

Die Grundstruktur des Syringaresinols ist ein 3,7-Dioxabicyclo (3.3.0)-oktan ("Bisepoxy lignan"). Die beiden aliphatischen Wasserstoffatome sind räumlich gleich orientiert, so daß das Tetrahydrofuran-Gerüst in gewinkelter Form vorliegt. Bei entgegengesetzter Orientierung würde das Ringsystem "verdrillt" und infolge der großen Ringspannung instabil sein.

Die diastereomeren Diglucoside des Lirioresinol A (Epi-Syringaresinol) und des Lirioresinol C (Dia-Syringaresinol) haben eine andere räumliche Anordnung der Phenylringe (107,108). Sie würden in der HPLC ein anderes chromatographisches Verhalten zeigen (136), d. h. bei einer anderen Retentionszeit eluieren, und können somit ausgeschlossen werden.

5. Identifizierung von Substanz D

Die Zone D der Dünnschichtchromatographie zeigte nach Aufnahme des UV-Spektrums mit dem Photodiodenarray (s. Kap. 2, II. 4.) ein mit Eleutherosid E identisches Spektrum. Aufgrund des höheren R_f -Wertes in der DC bzw. der größeren Retentionszeit in der HPLC vermuteten wir ein Monoglucosid des Syringaresinols. Zur Bestätigung führten wir eine Hydrolyse durch und verfolgten sie über DC und HPLC:

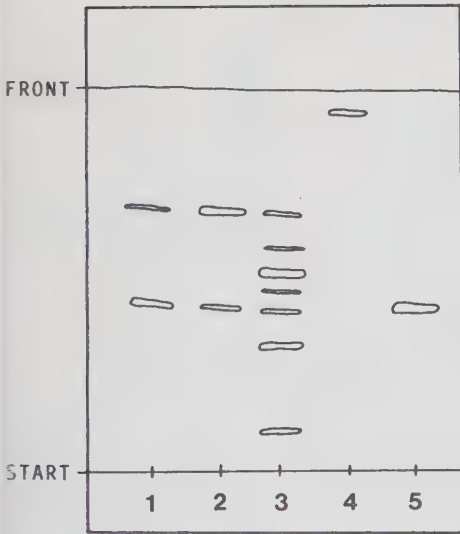
1. DC: (s. Abb. 9)

Nach einer Stunde Hydrolyse (50 % HOAc, 70 °C) erschien neben der Hauptzone bei $R_f = 0,44$ (Eleutherosid E) eine zweite Zone bei $R_f = 0,7$, die nach 3 1/2-stündiger Reaktion an Intensität deutlich zunahm. Beide waren auch im DC-Chromatogramm des Drogenextraktes nachweisbar. Bei noch stärkeren Hydrolysebedingungen (Bedampfen der DC-Auftragung mit HCl-Dampf) war nur noch eine Zone bei $R_f = 0,95$ sichtbar, die dem Aglykon Syringaresinol entsprach.

2. HPLC: (s. Abb. 11)

Der Peak des Eleutherosid E eluierte bei $R_t = 18,23$ min. Nach 1, 2 und 3 1/2 Stunden Hydrolysedauer erschien ein zweiter Peak bei $R_t = 26,40$ min, der mit wachsender Hydrolysezeit an Intensität zunahm und ein gleiches UV-Spektrum zeigte. Es konnte sich nicht um das Aglykon des Eleutherosid E handeln, da erst bei noch stärkerer Hydrolyse Syringaresinol entstand, das bei $R_t = 38$ min eluierte. Beide Peaks ($R_t = 18,23$ und $26,40$ min) waren auch in der HPLC des Drogenextraktes wiederzufinden.

Zone D stellt somit das Syringaresinol-4'-O- β -D-monoglucopyranosid dar (s. Abb. 10). Das Aglucon selbst, Syringaresinol, ist bereits von TAGUCHI und Mitarb. aus einer japanischen Mistelart (*Viscum album*, var. *coloratum*) isoliert worden (66).



Zuordnung:

- Zone 1: Hydrolyse, 1 h
 2: Hydrolyse, 3 1/2 h
 3: Viscum album, BuOH-Fraktion
 4: Hydrolyse mit HCl-Dampf
 5: Eleutherosid E

Det.: DC-D1

LM: DC-T1 (s. Exp. Teil)

Abb. 9: DC der Hydrolysate von Eleutherosid E

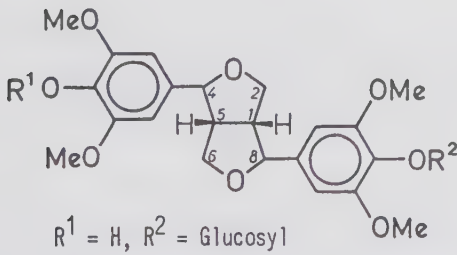


Abb. 10: Strukturformel von Syringaresinolmonoglucosid

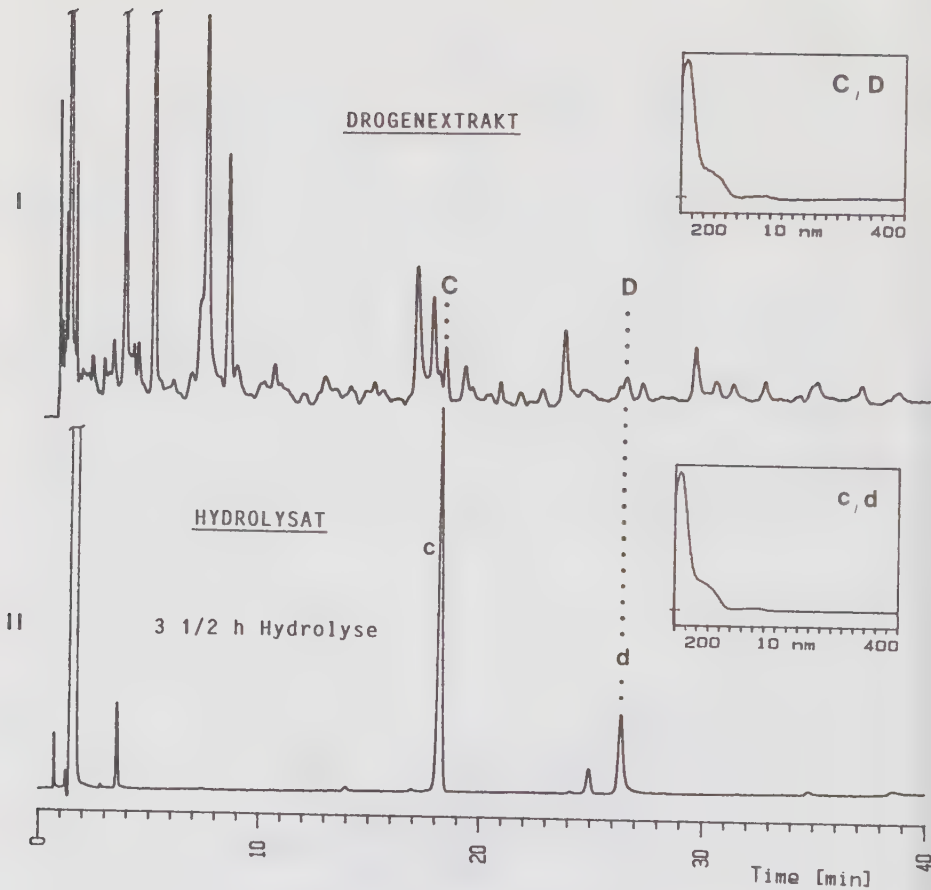


Abb. 11: HPLC des Drogenextraktes (I) und des Hydrolysates (II) von Eleutherosid E, Trennsystem TS-2 (s. Exp. Teil)

C/c : Eleutherosid E in Droge/Hydrolysat

D/d : Syringaresinolmonoglucosid in Droge/Hydrolysat

KAPITEL 2: Die Analytik von Viscum album-Extrakten und -Spezialitäten

Die in Kapitel 1 beschriebenen neu aufgefundenen Verbindungen A und B waren im Methanolextrakt und in der Butanolfraktion die am besten nachzuweisenden Hauptverbindungen. Da sie in **allen** von uns untersuchten Misteldrogen enthalten waren, sollten sie sich für eine DC- und HPLC-Fingerprintanalyse von Mistelextrakten eignen. Wir entwickelten daher entsprechende Verfahren, die auch zur quantitativen Bestimmung dieser Substanzen A und B sowie zur Standardisierung von Phytopräparaten verwendet werden konnten.

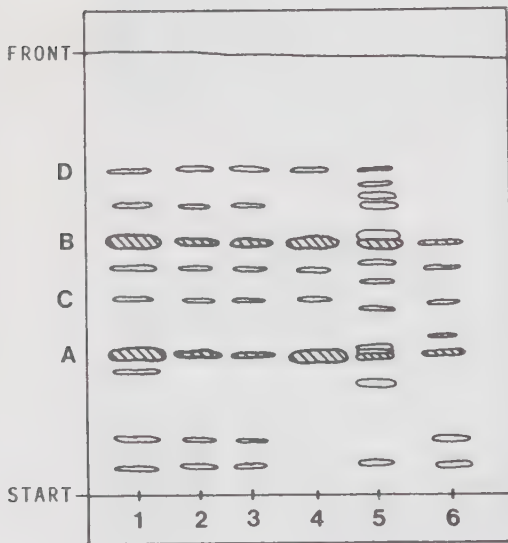
I. Dünnschichtchromatographie

Nach Testung verschiedener Laufmittelsysteme (s. Exp. Teil) hat sich das System DC-T1 CHCl_3 - MeOH - H_2O (70:30:4) am besten bewährt. Durch Anfärben der Dünnschichtchromatogramme mit Chlorsulfonsäure-Reagens (DC-D1) erhielten wir bei R_f 0,3 und 0,5 die Substanzen A und B im vis als deutlich blau-violette Hauptzonen, die bei guter Abtrennung unter UV 365 nm rot fluoreszierten. Bei einigen Phytopräparaten kam es zu Überlagerungen, so daß nicht in jedem Fall die Substanzen A und B sicher nachgewiesen werden konnten.

Die Substanzen C und D ließen sich als schwach blau-violette Zonen eindeutig nur in der Butanolfraktion der Drogenextrakte nachweisen. Für ihren Nachweis in Methanolextrakten waren die Konzentrationen meistens zu gering.

Abb. 12 zeigt die Dünnschichtchromatogramme von Drogenextrakten verschiedener Herkunft sowie von einem Mistel-Frischpflanzensaft und zwei Phytopräparaten.

Die DC eignet sich somit zur schnellen orientierenden Analyse. Bei Vorliegen komplexer Gemische (Kombinationspräparate) liefert diese Methode aber nicht immer sichere Ergebnisse. Auch für die quantitative Bestimmung der Substanzen A und B ist sie nicht geeignet.



Zuordnung:

Wirt:

- 1: Viscum album, Pinus
- 2: Viscum album, Malus
- 3: Viscum album, Quercus
- 4: Kneipp^R Mistel Pflanzensaft
- 5: Craviscum^R liquid.
- 6: Verus^R liquid.

Aufgetragen wurden die Butanolfraktionen

Det.: DC-D1

 blau-violett im vis

 UV 254 nm

LM: DC-T1

Abb. 12: DC-Analyse von Drogen verschiedener Herkunft und von Fertigpräparaten.

II. HPLC-Analyse der Mistelextrakte

1. Das Trennsystem

Da die Hauptverbindungen der Butanolfraktion (Substanzen A und B) sehr polare Eigenschaften zeigen, war eine Trennung über reversed-phase-Material (C-18) als stationäre Phase die Methode der Wahl. Etwa 80 % aller Trennungen niedermolekularer Verbindungen mittels HPLC können heute mit diesem Umkehrmaterial durchgeführt werden. Zum Einsatz kam eine LiChrospher 100 CH-18/2-Stahlsäule (5µm) der Fa. Merck (125 x 4 mm ID).

Als mobile Phase diente ein Acetonitril-Wasser-Gemisch. Um alle Substanzen der Butanolfraktion in einem Trennungsgang erfassen zu können, verwendeten wir die Gradientenelution: von 9 % Acetonitril bis 25 % Acetonitril in 35 min (linearer Anstieg) (Trennsystem T1, s. Exp. Teil). Für die quantitative Bestimmung zeigte sich das leicht modifizierte System T2 von Vorteil: Gradient von 8 % bis 25 % Acetonitril in 40 min (linear).

Wie aus den UV-Spektren der Substanzen A und B ersichtlich (s. Abb. 15), zeigen diese ausgeprägte Maxima bei $\lambda = 220$ nm und 264 nm. Da die Detektion bei 264 nm keine besser integrierbaren Chromatogramme lieferte, detektierten wir der höheren Empfindlichkeit wegen bei 220 nm.

2. Probenvorbereitung

Die Analysenlösungen müssen von stark lipophilen Begleitstoffen (Chlorophylle, Sterine etc.) befreit sein, da sich diese vom reversed-phase-Material nicht mehr eluieren lassen und die Trennsäule nach kurzer Zeit unbrauchbar machen würden. Von der nach folgendem Schema (Abb. 13) gewonnenen Butanolfraktion können 5 - 10 µl direkt zur HPLC eingespritzt werden. Ein entsprechendes HPLC-Chromatogramm zeigt Abb. 14 II.

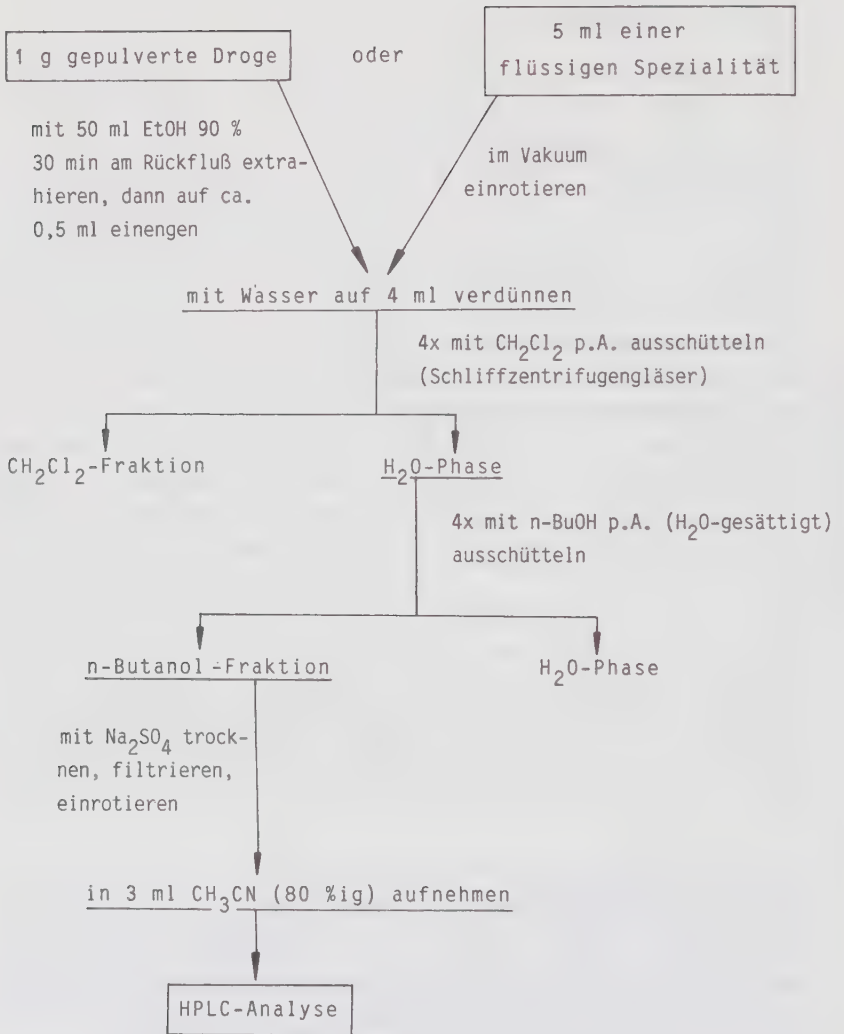


Abb. 13: Gewinnung der Butanolfraktion aus Droge oder Spezialität

3. Vergleich DC/HPLC

Wir chromatographierten mehrmals die Butanol-Fraktion der Droge auf 0,5 mm KG-Platten, markierten die fluoreszenzmin-dernden Zonen, eluierten diese mit Methanol und spritzten die konzentrierten Eluate in die HPLC ein. Die entsprechenden Zonen der DC sind in Abb. 14 den Signalen der HPLC zugeordnet.

Wie die beiden Chromatogramme zeigen, stimmt die Elutionsreihenfolge in der HPLC nicht mit der DC überein. Syringin (B) - in der DC bei $R_f = 0,5$ - wird z. B. in der HPLC noch vor Syringeninapiosylglucosid (A) eluiert. Die Zone F muß noch ein Gemisch darstellen, da der Peak bei $R_t = 13,3$ min (F_2) auf der DC ebenfalls eine Zone direkt über Syringin lieferte.

Eine **Hydrolyse** der BuOH-Fraktion mit 1N-HCl (1 Std., 100 °C) zeigte, daß es sich auch bei den Verbindungen E, F und G um Glykoside handeln mußte, da nach der Säure-Behandlung auf der DC nur noch Zonen über $R_f 0,8$ auftraten, die vorher nicht zu beobachten waren.

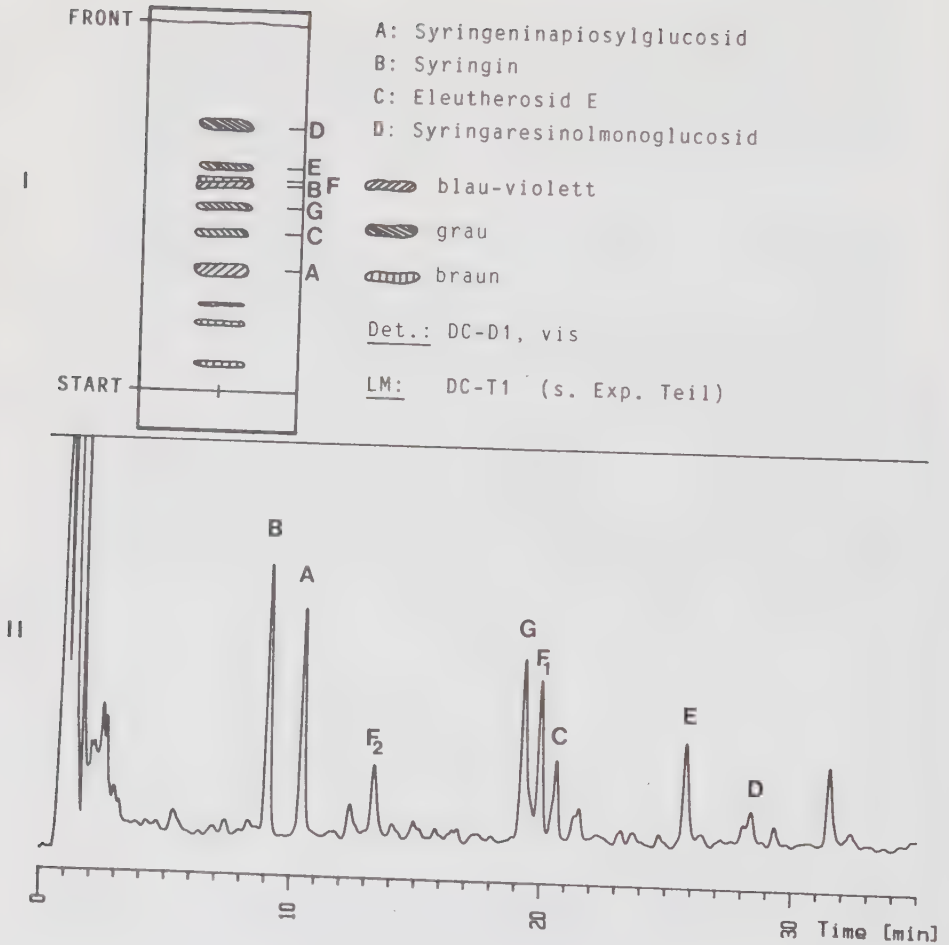


Abb. 14: Zuordnung der DC-Zonen zur HPLC
Trennsystem TS-1 (s. Exp. Teil)

4. Weitere Charakterisierung dieser Verbindungen mit Hilfe der Photodiodenarray-Technik

Die Photodiodenarray-Detektion erlaubt es, von den eluierenden Substanzen on-line - d. h. ohne die Trennung zu unterbrechen und damit das Chromatogramm zu verändern - UV-Spektren aufzunehmen. Man erhält damit außer der (relativen) Retentionszeit weitere aussagekräftige Informationen über die Identität der eluierenden Substanzen. Diese Technik ist vor allem bei der Analyse von komplexen Naturstoffgemischen bzw. Drogenextrakten von großem Vorteil.

Beim Photodiodenarraydetektor durchstrahlt das Licht einer Deuteriumlampe die Flußzelle und wird anschließend über ein holographisches Gitter in den interessierenden Wellenlängenbereich (UV-vis) aufgefächert. Dabei wird aber nicht mit einer Photozelle ein Punkt aus dem Spektrum registriert (wie im herkömmlichen Spektralphotometer), sondern ein Chip mit 211 dicht beieinanderliegenden kleinen Photozellen mißt das gesamte Spektrum (190 - 600 nm max.) gleichzeitig. So kommt zur Zeit- und Absorptionsachse des gewohnten Chromatogramms noch die Wellenlängenchse als dritte Dimension hinzu.

Somit können zu beliebigen Zeitpunkten des Chromatogramms, wenn nötig, alle 10 ms, die aktuellen UV-Spektren der eluierenden Peaks registriert und gespeichert werden. Die große Datenfülle muß von einem Computer verarbeitet und gespeichert werden. Danach können die Informationen abgerufen und neu verarbeitet werden.

Neben der Möglichkeit, das Chromatogramm bei bis zu acht verschiedenen Wellenlängen gleichzeitig registrieren und ausdrucken lassen zu können, kann auch zu bestimmten Zeitpunkten (z. B. im Peakmaximum, in den beiden Wendepunkten) das UV-Spektrum automatisch gespeichert werden. Dies dient in erster Linie zur Kontrolle der Peakidentität bei bekannter Substanz. Unbekannte Verbindungen können damit oft sofort einer bestimmten Stoffklasse (z. B. Flavonoide) zugeordnet werden.

Abb. 15 zeigt das Elutionsprofil eines methanolischen *Viscum album*-Extraktes (Stengel, Wirt: *Tilia cordata*) zusammen mit den UV-Spektren der Hauptsignale (Substanzen A und B).

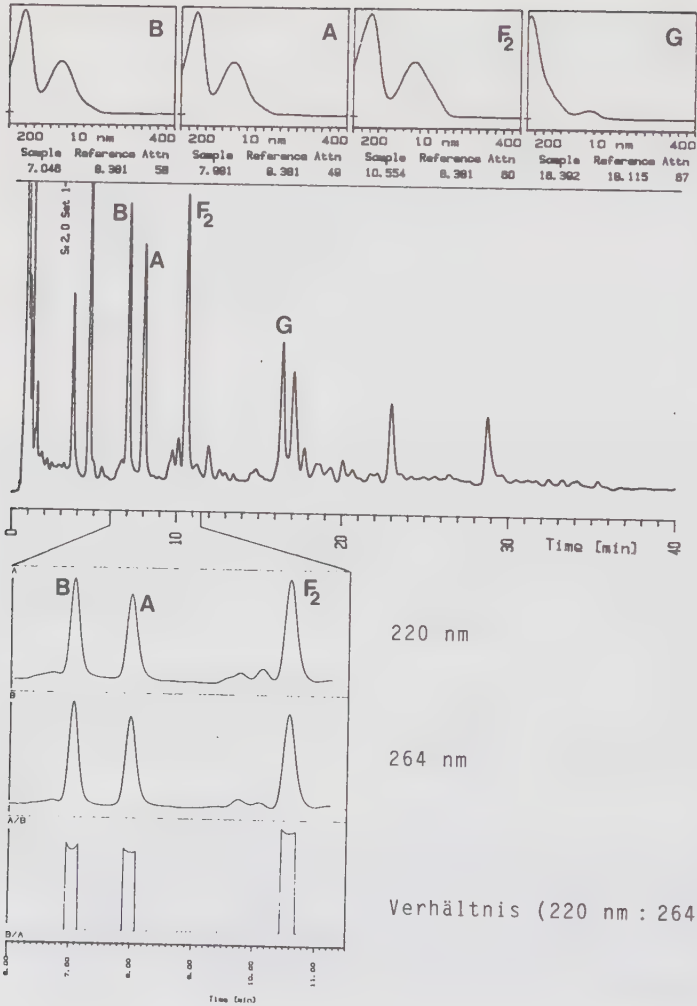


Abb. 15: HPLC-Chromatogramm von *Viscum album*, Stengel, Wirt *Tilia cordata*, mit entsprechenden UV-Spektren und ratio-plot
Trennsystem TS-2 (s. Exp. Teil)

4.1. Kontrolle der Peakreinheit

Die quantitative Auswertung von Chromatogrammen setzt das Erkennen einer Peakverunreinigung voraus. Hierzu registriert man das Chromatogramm bei zwei verschiedenen Wellenlängen. Das Verhältnis der beiden Signale muß bei einem reinen Peak konstant bleiben. Ist eine zweite Substanz überlagert, verändert es sich, vorausgesetzt, daß sich die UV-Spektren etwas voneinander unterscheiden.

Wie sich aus der entsprechenden Darstellung des *Viscum album*-Chromatogramms (Abb. 15) entnehmen läßt, werden die Peaks A und B in reiner Form eluiert.

4.2. 3-dimensionale Darstellung des HPLC-Chromatogramms

Entsprechend den drei registrierten Parametern **Zeit / Wellenlänge / Absorption** läßt sich das Chromatogramm auch 3-dimensional darstellen. Signale mit gleichen UV-Spektren können hier leicht zugeordnet werden (Darstellung s. Abb. 16 I).

Der Übersichtlichkeit halber empfiehlt es sich, nur relativ kurze Zeitausschnitte (max. 5 bis 7 Peaks) ausdrucken zu lassen. Um ein hinter einem "Berg" verstecktes Signal sichtbar zu machen, gibt es die Möglichkeit der Darstellung mit links- und rechtsseitigem Blickwinkel.

Aufgrund der komplizierten Datenauswahl bei der Aufzeichnung der Chromatogramme ist diese Art der Darstellung für die Routineanalytik zu aufwendig, sie ist hier auch nicht notwendig.

4.3. Isoabsorbance plot

Analog dem 3D-Plot kann das Chromatogramm auch in einer "topographischen" Aufsicht dargestellt werden, bei der die Absorptionsachse senkrecht zur Papierebene steht. Die Intensität des Signals wird durch die Anzahl der "Höhenlinien" angegeben (Darstellung s. Abb. 16 II).

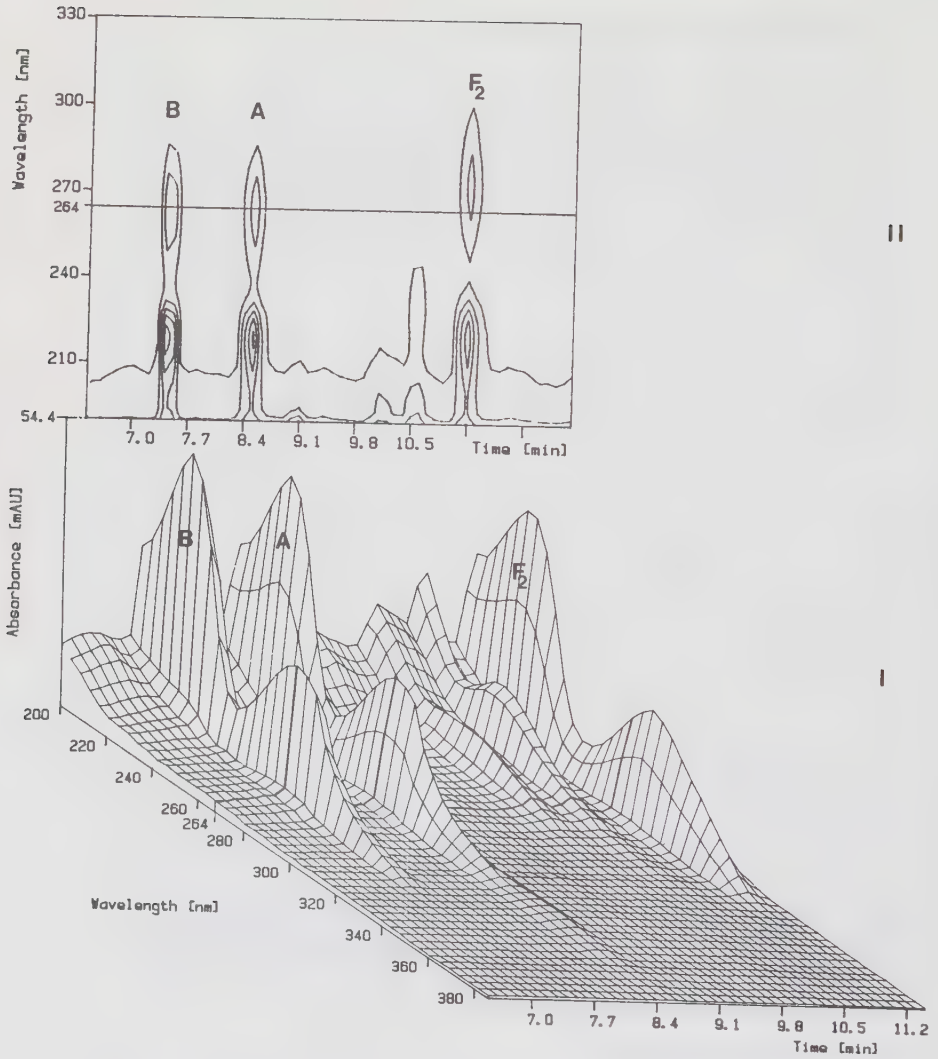


Abb. 16: 3-dimensionale Darstellung (I) des Chromatogramms aus Abb. 15 mit Isoabsorbance plot (II).
Trennsystem TS-2 (s. Exp. Teil)

Peaks mit gleichem UV-Spektrum (A und B) fallen sofort auf. Man sieht auch, daß bei Peak F₂ das längerwellige Maximum etwas bathochrom verschoben ist, im 3D-Plot erkennt man dies erst deutlich, wenn die Linie einer bestimmten Wellenlänge (z. B. bei 264 nm im zweiten Maximum) verstärkt eingezeichnet wird (s. Abb. 16 I).

Aufgrund des großen Zeitbedarfs des Rechners beim Erstellen des Plots, ist diese Art der Darstellung mit dem uns zur Verfügung stehenden HP 85B Tischcomputer (Hewlett Packard) für die Routineanalytik zu aufwendig.

5. Quantitative Bestimmung der Phenylpropanderivate im Drogenextrakt

Das Phenylpropanderivat Syringin ist im Pflanzenreich relativ weit verbreitet. In der Familie der Oleaceae kommt es gehäuft vor (100-103). Die Verbindung kann daher allein nicht als Identitätskriterium für *Viscum album* dienen. Das ebenfalls in allen untersuchten Mistelchargen (bezogene und selbstgesammelte Drogen) enthaltene Syringeninapiosylglucosid wurde dagegen noch nicht beschrieben. Beide Substanzen können somit zusammen als sicheres Identitätsmerkmal für die Droge dienen. Aus diesem Grund entwickelten wir eine Methode zu ihrer quantitativen Bestimmung.

5.1. Probenaufbereitung

Aufgrund der unterschiedlichen Verteilungsfaktoren der Verbindungen bei der Butanol / Wasser- Ausschüttelung gibt die Butanolfraktion nicht den ursprünglichen Gehalt in der Droge wieder. Während das weniger hydrophile Syringin zum größten Teil in die Butanolphase übergeht, bleibt beim hydrophileren Syringeninapiosylglucosid ein nicht zu vernachlässigender Anteil in der wäßrigen Phase zurück. Die Butanolfraktion ist somit für eine Fingerprintanalyse, nicht aber für eine quantitative Bestimmung geeignet.

Eine **gleichmäßige Anreicherung** der Phenylpropanverbindungen läßt sich durch Filtration des methanolischen Extraktes über reversed-phase-Material erreichen, z. B. über SepPak C-18-Kartuschen (Fa. Waters). Die lipophileren Bestandteile (Chlorophyll etc.) bleiben auf dem Umkehrmaterial gebunden, während sich die nachzuweisenden Verbindungen mit 50 %igem Acetonitril eluieren lassen. Um die SepPak C-18-Kartuschen nicht zu überladen, wird der Methanolauszug zuvor in einem Methanol-Wasser (2:1)-Gemisch aufgenommen, wobei ein Teil der lipophileren Bestandteile ausfällt und durch Filtration über Watte, die sich im Einlaß der SepPak-Kartusche befindet, abgetrennt werden kann.

Diese Art der Anreicherung führt zu reproduzierbaren Ergebnissen und läßt sich relativ schnell durchführen. Die genaue Arbeitsvorschrift ist im Exp. Teil (S.118) angegeben.

5.2. Innerer Standard

Um etwaige Substanzverluste bei der Extraktbereitung auszugleichen, wurde die Methode des Inneren Standards gewählt. Er wird vor der Extraktion der Droge dem Ansatz zugefügt.

Folgende Anforderungen sind an einen geeigneten Inneren Standard zu stellen:

- Er soll den zu bestimmenden Substanzen strukturell ähnlich sein und damit einen molaren Extinktionskoeffizienten gleicher Größenordnung haben. In diesem Fall wäre das eine polare phenolische Verbindung.
- Er darf in der Droge nicht bereits enthalten sein und soll sich mit keiner anderen Substanz des Chromatogramms überlagern.
- Er muß in Reinform zu einem akzeptablen Preis erhältlich sein.

Von allen in Frage kommenden Verbindungen erwies sich Resorcin als die am besten geeignete Substanz. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte über die Peakflächen.

5.3. Eichgeraden

Um zu überprüfen, inwieweit eine lineare Abhängigkeit zwischen Substanzmenge (μg) und Peakfläche (A_r) besteht, wurden unterschiedliche Mengen einer Eichlösung von Resorcin und Syringin eingespritzt. Die Eichgeraden zeigt Abb. 17. Der Korrelationskoeffizient, ein Maß für die Lage der Meßpunkte auf der Geraden, betrug jeweils 0,9999 (s. auch Exp. Teil, Tab. 23).

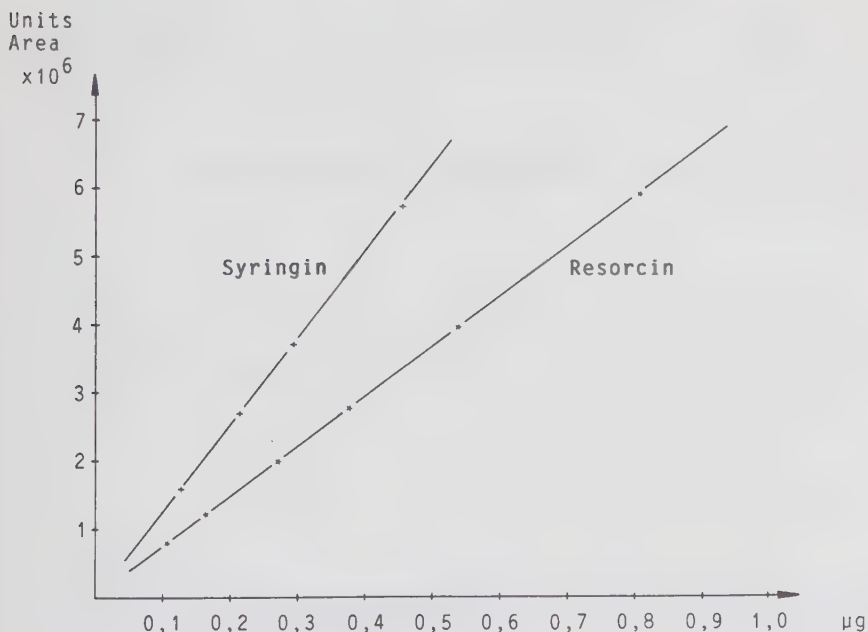


Abb. 17: Eichgeraden von Syringin und Resorcin

Demnach besteht eine lineare Abhängigkeit von Peakfläche und injizierter Menge bei Resorcin im Bereich von 0,1 μg bis mindestens 1 μg , bei Syringin von 0,1 μg bis mindestens 0,5 μg .

5.4. Responsefaktoren

Über die Eichgeraden und über die mehrmalige Einspritzung einer Kalibrierlösung (Lösung einer bekannten Menge Resorcin und Syringin) wurden die Responsefaktoren berechnet (RF = Menge : Fläche):

	Menge (pro 5 ml inj.)	Fläche (Ar)	RF (µg/Ar)
Resorcin	0,32832 µg	2502820	$1,3118 \times 10^{-7}$
Syringin	0,312 µg	4046530	$7,7103 \times 10^{-8}$

Tab. 8: Responsefaktoren von Resorcin und Syringin

Die Extinktionen und damit auch die Peakflächen zweier Substanzen mit gleichen Chromophoren verhalten sich bei gleicher Konzentration umgekehrt proportional zu den Molekulargewichten:

$$\frac{E_x}{E_y} = \frac{Ar_x}{Ar_y} = \frac{MG_y}{MG_x} \quad .$$

Somit sind die Quotienten der Responsefaktoren den Quotienten der Molekulargewichte direkt proportional:

$$\frac{RF_x}{RF_y} = \frac{MG_x}{MG_y} \quad .$$

Mit Hilfe dieser Formel läßt sich auch für Syringeninapiosylglucosid ein Responsefaktor berechnen:

$$\begin{aligned} \text{Rf (Syringeninapiosylglucosid)} &= \frac{7,7103 \times 504,23}{372,18} \times 10^{-8} = \\ &= 1,0446 \times 10^{-7}. \end{aligned}$$

Wir verwendeten einen HP 3392A-Integrator (Hewlett Packard). Der Prozentgehalt der Droge berechnet sich nach folgender Formel *:

$$\% (S) = \frac{\text{Ar (S)} \times \text{RF(S)}}{\text{Ar (IS)} \times \text{RF (IS)}} \times \frac{\text{Menge (IS)}}{\text{EW(Droge)}} \times 100 \% .$$

-
- * IS: Interner Standard
S : Zu bestimmende Substanz
EW: Einwaage
Ar: Flächeneinheiten
RF: Responsefaktor (Menge:Fläche).

5.5. Genauigkeit der Methode

5.5.1. Standardabweichung

Zur Bestimmung der relativen Standardabweichung wurden fünf Einspritzungen eines Extraktes von *Viscum album* (Fa. ICI, L.J.34582) ausgewertet (repräsentatives Beispiel):

		Syringin	Syringenin- apiosylglucosid
Mittelwert (n = 5)	$\bar{x}$	42,98 mg-%	44,47 mg-%
abs. Standardabweichung	s_{n-1}	1,40 mg-%	1,96 mg-%
rel. Standardabweichung	$s_{rel.}$	3,26 %	4,41 %

Tab. 9: Standardabweichung

Eine neue Säule lieferte aufgrund schärferer Trennung und damit gleichmäßigerer Integration eine relative Standardabweichung von etwa 2 %. Mit einer bereits länger gebrauchten Säule errechneten sich wegen Peakverbreiterung und damit möglicher Überlappung kleiner Peaks auch höhere Werte, im schlechtesten Fall bis etwa 7 %.

5.5.2. Wiederfindungsrate

Hierzu ermittelten wir den Gehalt einer Analysenlösung vor und nach Zusatz einer bestimmten Menge Syringin. Dabei konnten 98,1 % der zugesetzten Menge wiedergefunden werden.

5.6. Ergebnisse der quantitativen Bestimmungen

	mg/100 g Droge		
	Syringin	Syringenin- apiosyl- glucosid	Gesamt- gehalt
Viscum album, Wirt: Pinus	210,0	209,3	419,3
Viscum album, Wirt: Malus	64,5	53,2	117,3
Viscum album, Wirt: Quercus	58,9	33,5	92,0
Viscum album, Wirt: Tilia cordata			
a) Blätter	17,6	34,3	51,9
b) Zweige	48,2	67,0	115,2
c) Beeren	26,7	9,8	36,5
Viscum album, Fa. Birkenweg (Art. 103071, Muster 577/5)	63,9	66,2	130,1
Viscum album, Fa. ICI (L.J. 34582)	43,0	44,5	87,5
Viscum album, Wirt: Ulmus glabra (nur Zweige)	76,5	92,8	169,3
Viscum album, var. coloratum	--	--	--

Tab. 10: Gehalt an Phenylpropanverbindungen in verschiedenen
Misteldrogen.

Angegeben sind die Mittelwerte aus mindestens drei
Bestimmungen.

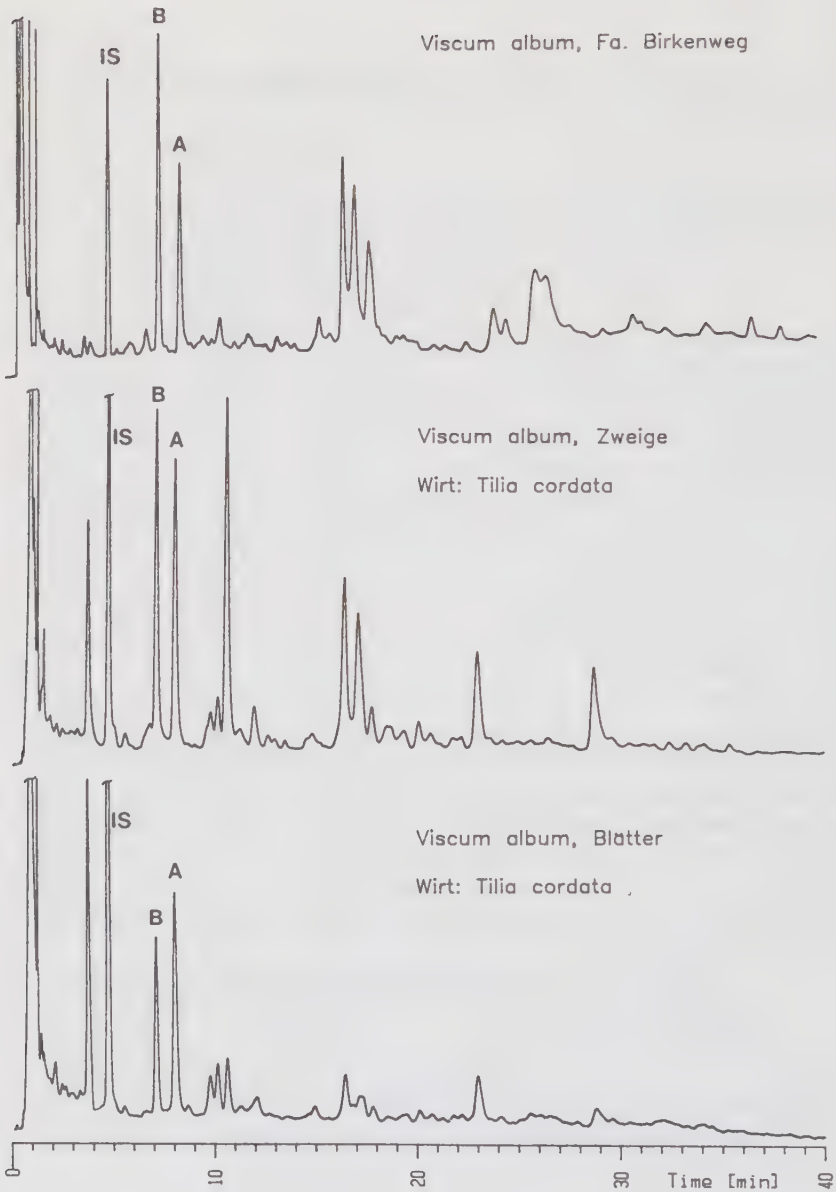


Abb. 18: HPLC von Mistel-Drogen verschiedener Herkunft
Trennsystem TS-2 (s. Exp. Teil)

Zunächst konnten wir feststellen, daß sich der HPLC-Fingerprint unabhängig von Wirt oder Herkunft der Droge in allen untersuchten Misteln entsprach und die typischen Hauptinhaltsstoffe nachweisbar waren (Ausnahme: *Viscum album*, var. *coloratum*; einige Drogen - Chromatogramme sind in Abb. 18 dargestellt). Die beiden Phenylpropane Syringin (B) und Syringeninapiosylglucosid (A) waren immer die dominierenden Hauptverbindungen. Der Gehalt beider Verbindungen lag zwischen 40 mg und 70 mg, im Durchschnitt etwas über 50 mg pro 100 g Droge. Nur bei *Viscum album*, Pini ist der Gehalt mit jeweils über 210 mg-% deutlich erhöht. Die Konzentrationen von Syringin und Syringeninapiosylglucosid waren meist gleich hoch.

Der Gesamtgehalt an Phenylpropanverbindungen liegt immer in einem Bereich von etwa 90 bis 140 mg pro 100 g getrockneter Droge (Ausnahme: *Viscum album*, Pini). Am höchsten ist der Gehalt in den Zweigen. Blätter und Beeren enthalten weniger Phenylpropanverbindungen.

Die Lignane Syringaresinolmono- bzw. diglucosid (D bzw. C), die nur in sehr geringen Mengen enthalten waren, konnten nicht in allen Fällen nachgewiesen werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß diese Verbindungen erst bei der Trocknung der Droge in nennenswerter Menge entstehen. Das würde bedeuten, daß die unterschiedliche Trocknungsart einen Einfluß auf deren Gehalt hat. Eleutherosid E ist aber sicher **genuiner** Bestandteil der Pflanze. Es war auch in der selbst geernteten und sofort gefriergetrockneten Droge (*Viscum album*, *Tiliae*) nachzuweisen. In den Pflanzensäften erschien Eleutherosid E in etwas höherer Konzentration (vgl. III.1.).

In der von uns untersuchten Mistelart *Viscum album*, var. *coloratum* konnten wir weder Phenylpropane noch Lignane nachweisen. Diese in Korea gewachsene Mistel kann über den DC- und HPLC-Fingerprint sicher von den drei Europäischen Mistelarten (*Viscum album*, var. *mali*, var. *abietis* und var. *pini*) abgegrenzt werden.

III. Analyse von mistelhaltigen Fertigpräparaten

34 Mistel enthaltende Präparate, die als "Kardiakum" und "Antihypertonikum" Anwendung finden, sind in Deutschland auf dem Arzneimittelmarkt. Auch fünf Geriatrika und sieben Antisklerosemittel enthalten Mistelextrakte (28). Am häufigsten ist die Anwendung in Form von Tropfen und Säften, bei den Geriatrika dagegen die Drageeform.

Zur Herstellung der Präparate werden meist wäßrig-alkoholische Extrakte gewonnen. In einigen Fällen kommen aber auch rein wäßrige Extrakte oder Preßsäfte zur Anwendung. Den Dragees werden die getrockneten Extrakte, selten direkt die fein gepulverte Droge, zugesetzt.

Die Mistel kommt in der Phytotherapie kaum allein zur Anwendung. Sie findet sich meist in Kombination mit anderen Pflanzen, bevorzugt mit *Crataegi folium c. flore oder fructus*. Die bis zu 16 Drogenbestandteile enthaltenden Präparate (z. B. *Ju-mistan*^R Tropfen) stellen hohe Anforderungen an die Analytik. Die Zusammensetzung der von uns untersuchten Fertigpräparate ist im Exp. Teil angegeben.

In der Krebstherapie ("palliative Karzinomtherapie") werden die Präparate *Iscador*^R, *Plenosol*^R und *Helixor*^R verwendet (28). Hierfür werden aus der Frischpflanze (*Viscum album* von *Pinus*, *Malus* und *Quercus*) die Preßsäfte gewonnen und über eine anschließende Milchsäuregärung haltbar gemacht. *Plenosol*^R wird z. B. noch mit Hilfe von Nekrose-Einheiten (Kaninchenhaut) standardisiert und auf drei verschiedene Stärken eingestellt. Eine phytochemische Standardisierung wurde bisher nicht vorgenommen.

1. DC und HPLC von Preß- und Gärsäften

Je 30 µl "Preß- bzw. Gärstoff", wie sie zur Herstellung von Iscador^R verwendet werden, wurden zur DC direkt aufgetragen. In den **Frischsäften** ließen sich nach Entwicklung und Detektion - wie in den entsprechenden Drogenextrakten - Syringin und Syringeninapiosylglucosid als deutliche Hauptzonen identifizieren. Die übrigen Zonen entsprachen dem Mistelfingerprint und waren hauptsächlich durch UV-Minderung erkennbar.

Bei allen untersuchten **Gärsäften** fehlten die Zonen des Syringins, was vermutlich auf einen teilweisen Abbau der Glykoside bei der Milchsäuregärung zurückzuführen ist. Die untere Zone des Apiosylglucosids war dagegen in jedem Fall noch deutlich erkennbar.

Bei dem Präparat Iscador Qu Fr F 10 % konnten wir wegen zu starker Verdünnung des Präparates nach der direkten Auftragung keine Zonen mehr erkennen.

Zur quantitativen Bestimmung der Phenylpropanverbindungen über HPLC wurde Resorcin als Innerer Standard den Säften zugesetzt und die Lösung, wie im Exp. Teil beschrieben, aufgearbeitet. Die Chromatogramme zeigt Abb. 19.

In Tab. 11 sind die ermittelten mg-Prozentgehalte an Syringin und Syringeninapiosylglucosid für die Säfte und zum Vergleich für die Ausgangsdrogen zusammengestellt.

			mg pro 100 g getr. Pflanze oder Saft	
	Chargen-Nr.		Syringin	Syringenin- apiosylglucosid
a) Droge	Pini	627 II	210,0	209,3
	Mali	629	64,5	53,2
	Querci	631	58,9	33,5
b) Frischsäfte	Pini		243,8	110,8
	Mali		70,6	60,7
	Querci		56,5	53,7
c) Gärsäfte	Pini	620	1,7	22,8
	Mali	621	8,7(!)	15,8
	Querci	623	--	12,8

Tab. 11: Gehalt an Phenylpropanverbindungen in der Droge, den Frisch- und den Gärsäften.

- Syringin (B) und Syringeninapiosylglucosid (A) sind in allen Proben die für die Mistel typischen Hauptpeaks.
- In allen drei Frischsäften läßt sich außerdem Eleutherosid E (C) eindeutig als kleiner Peak bei $R_t = 18,0$ min detektieren.
- Alle Gärsäfte zeichnen sich durch einen geringen oder fehlenden Gehalt an Syringin aus. Dies kann als Indikator für einen vergorenen Mistelsaft gelten. Sehr wahrscheinlich kann an dem Syringingehalt auch die Vollständigkeit des Gärprozesses abgelesen werden.

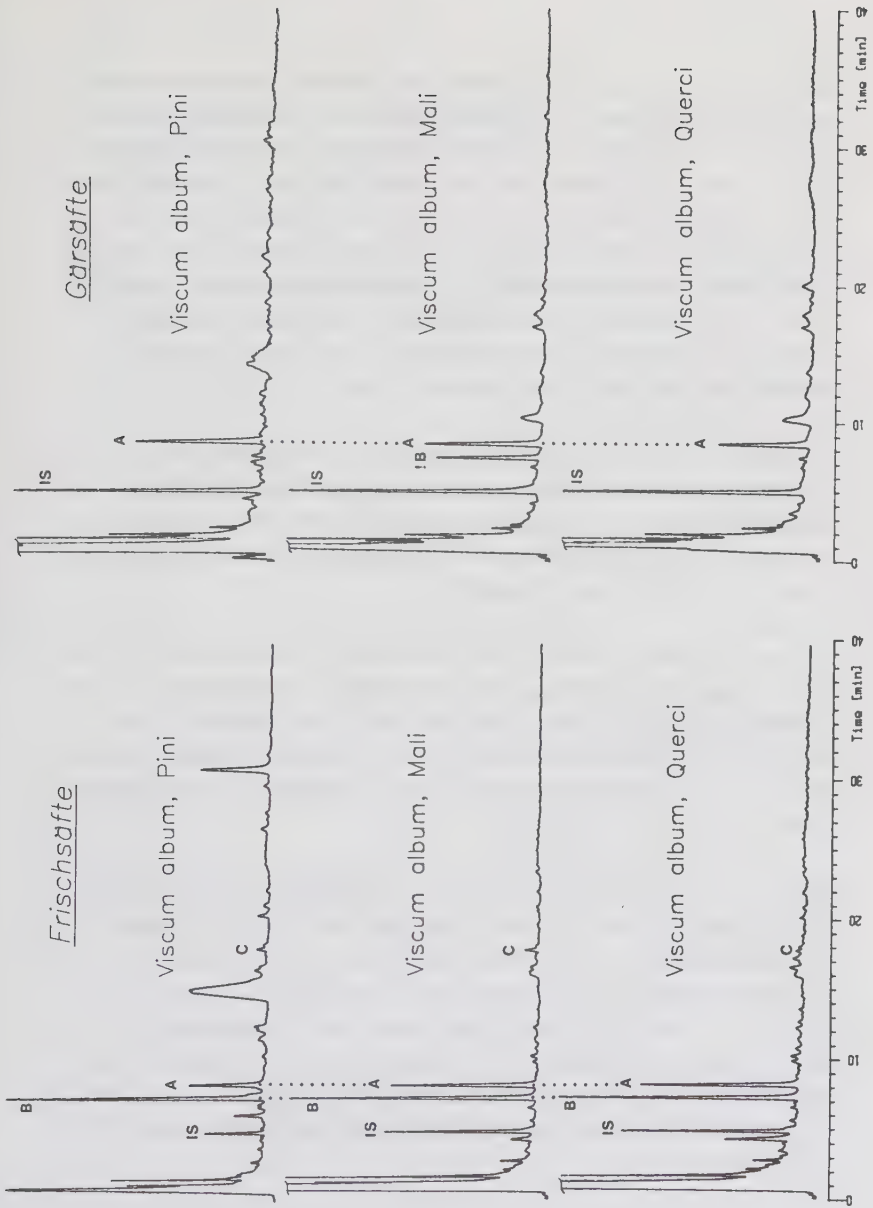


Abb. 19: HPLC der "Preßsäfte" und "Gärsäfte" aus *Viscum album*
Trennsystem TS-2 (s. Exp. Teil)

Der Gärssaft von *Viscum album*, Mali stellt eine Ausnahme dar. Offenbar wurde der Gärprozeß vorzeitig abgebrochen. So läßt sich in diesem Gärssaft noch gut Syringin, wenn auch in deutlich verminderter Konzentration, nachweisen.

- Syringeninapiosylglucosid zeigt sich der Milchsäuregärung gegenüber beständiger. Die endständige Apiose erschwert vermutlich den Hydrolyseprozeß. Wir fanden diese Verbindung noch in allen drei Gärssäften, wenn auch in etwas verminderter Konzentration, wieder.
- Da ein Teil Frischsaft lt. Herstellerangabe einem Teil Droge entsprechen soll, waren für Droge und Frischsaft annähernd gleiche Gehalte zu erwarten. Wie Tab. 11 zeigt, liegen im Frischsaft die Phenylpropanverbindungen nur geringfügig höher konzentriert vor.
- Lt. Herstellerangabe sollen zwei Teile Gärssaft (50 %) etwa einem Teil Frischpflanze entsprechen. Der Gehalt an Syringeninapiosylglucosid ist im Gärssaft aber nur noch ca. ein Drittel so hoch wie in der Frischpflanze. Folglich muß es durch die Milchsäuregärung zu etwa einem Drittel abgebaut worden sein.
- Das Konzentrationsverhältnis von Syringeninapiosylglucosid zu Syringin liegt in der Droge und im Frischsaft immer in annähernd gleicher Größenordnung. Meist beträgt der Gehalt an Syringeninapiosylglucosid 80 bis 105 % des Gehalts an Syringin. Der niedrigste gemessene Wert betrug 45,5 %. Da die spezifische Extinktion des Biosids aufgrund des höheren Molekulargewichtes niedriger liegt als beim Monosid, geben die Peakhöhen nicht direkt das Konzentrationsverhältnis wieder.

- *Viscum album*, *Pini* fällt im Gehalt an beiden Phenylpropanverbindungen aus dem Rahmen. Er liegt etwa drei bis viermal höher als bei den anderen Drogenmustern.

Zusätzlich lassen sich in dieser Droge noch weitere Verbindungen nachweisen, die bei *Viscum album*, *Mali* und *Querci* fehlen: ein breit eluierendes Substanzgemisch bei $R_t = \text{ca. } 27 \text{ min}$ und ein ebenfalls breiter Peak bei $R_t = 9,4 \text{ min}$. Die Verbindung bei $R_t = 9,4 \text{ min}$ muß glykosidischer Natur sein, denn im Frischsaft der Pflanze lassen sich zwei von ihr abgeleitete Substanzen detektieren ($R_t = 15$ und 31 min). Diese besitzen identische Chromophore (gleiches UV-Spektrum und somit wahrscheinlich gleiches Aglykon), sind aber um ein oder zwei Mol Zucker ärmer. Im Gärssaft sind sie nicht mehr nachweisbar.

- Im Präparat *Iscador Qu Fr F 10 %* konnten wir - im Gegensatz zur DC - ebenfalls die beiden typischen Signale der Phenylpropanverbindungen finden. Die quantitative Bestimmung erfolgte allerdings nicht mit Internem Standard, da hierdurch eine Verdünnung erfolgt wäre. Nach der Methode des Externen Standards errechnet sich folgender Gehalt:

Syringin:	1,17 mg/100 ml
Syringeninapiosylglucosid:	1,28 mg/100 ml.

- Bei einer zweiten Analysenreihe wurden drei Gärsäfte Visci albi, Mali verschiedener Chargen miteinander verglichen:

	mg pro 100 g Gärsaft	
	Syringin	Syringenin- apiosylglucosid
Nr. 621	9,3	16,6
Nr. 621*	8,4	16,7
Nr. 629	---	12,5
Beerengärschleim 621	2,4	0,85

Tab. 12: Gehalt an Phenylpropanverbindungen in einigen Gär-säften

- Der relativ hohe Gehalt von Syringin im Gärsaft Nr. 621 (vermutlich identisch mit dem aus der ersten Lieferung) läßt wiederum erkennen, daß hier der Gärprozeß vorzeitig abgebrochen wurde.
- Bei Charge Nr. 621* gibt die Herstellerfirma an, daß nach Öffnung der Flaschen eine Nachgärung eingetreten war und ein schlechter Geruch festgestellt wurde. Die HPLC-Analyse bestätigt dies.
- Charge Nr. 629 wurde vollständig vergoren: es ist kein Syringin mehr feststellbar.
- Zusätzlich untersuchten wir einen "Beerengärschleim". Auch hier waren beide Phenylpropanverbindungen nachweisbar, wenn auch in wesentlich geringerer Konzentration. Da Beeren in der Gesamtdroge gewichtsmäßig aber nur einen geringen Anteil darstellen, kommt deren niedrigem Gehalt nur wenig Bedeutung zu.

2. Analyse von Asgoviscum^{R*} und Asgoviscum forte^{R*} liquid.

Im folgenden sollte an Hand von Mistel-Arzneizubereitungen, die außer Mistelextrakt auch noch andere Extrakte (z. B. Cra-taegi fr.) enthalten, geprüft werden, ob die für den reinen Mistelextrakt ausgearbeitete quantitative Bestimmung der Phenylpropanverbindungen auch auf diese Präparate anwendbar ist.

2.1. Quantitative Bestimmung der Phenylpropanderivate

Zur Herstellung des Präparates werden aus den Drogen die wäßrig-alkoholischen Extrakte gewonnen, die dann anschließend zu der Spezialität weiterverarbeitet werden. Die quantitative HPLC-Bestimmung führten wir zuerst mit der Tinct. Visci albi durch, bevor wir sie auf das Endprodukt Asgoviscum^R bzw. Asgoviscum forte^R liquid. übertrugen.

2.1.1. In Tinct. Visci albi

Der zur Herstellung von Asgoviscum^R verwendete wäßrig-alkoholische Extrakt (Tinct. Visci albi) enthält einen hohen Anteil an sehr **polaren** Verbindungen (Gerbstoffe etc.). Diese machen sich in der HPLC-Analyse störend bemerkbar: die polaren Phenylpropane und der Innere Standard Resorcin werden dadurch nicht mehr grundliniengetrennt, da diese nach Start der Analyse nur langsam wieder erreicht wird. Eine ungenaue Integration ist die Folge. Es müssen also zuvor die sehr polaren und auch die lipophilen Begleitstoffe abgetrennt werden.

Mit einer Mischung aus Dichlormethan und Methanol (1:1) werden zu polare Verbindungen ausgefällt und durch anschließende

* Zusammensetzung: s. Exp. Teil

Filtration über eine SepPak Si-Kartusche abgetrennt. Die folgende Filtration über SepPak C-18 diente zur Schonung der Säule.

Die genaue Probenaufbereitung ist im Exp. Teil S. 119 angegeben.

Als Innerer Standard wurde wiederum Resorcin verwendet. Er wurde zu Beginn der Probenaufbereitung der Tinktur zugesetzt. Die Responsefaktoren konnten von der Analyse der reinen Misteldroge übernommen werden.

Ergebnisse:

	mg/100 ml Tinktur	
	Syringin	Syringenin- apiosylglucosid
Tinct. Visci albi		
LJ-Nr. 35 389 (1.3.83)	3,4	13,5
Tinct. Visci albi cum Crataegi		
LJ-Nr. 588 (4.3.83)	13,8	17,5

Tab. 13: Phenylpropan-Gehalt in Tinct. Visci albi

Nach den vorangegangenen Untersuchungen sind in 100 g getrockneter Droge etwa 50 mg Syringin und Syringeninapiosylglucosid enthalten. In 100 ml Tinct. Visci albi (1:5-Ansatz) sollten dementsprechend ca. 10 mg je Phenylpropanverbindung wiederzufinden sein. Die in Tab. 13 angegebenen Werte lagen in dieser Größenordnung. Die untersuchten Chargen hatten zum Zeitpunkt der Analyse bereits eine zweijährige Lagerungszeit hinter sich.

2.1.2. Im Fertigpräparat Asgoviscum^R bzw. Asgoviscum forte^R liquid.

Die Probenaufbereitung entsprach mit Ausnahme der verwendeten Ausgangsmenge Tropfen der Extraktionsvorschrift von Tinct. Visci albi (s. Exp. Teil, S.119). Die verwendeten Responsefaktoren waren die gleichen, ebenso der zugesetzte Innere Standard (s. Abb. 20).

2.1.2.1. Ergebnisse

Neben einer Reihe älterer Chargen (vgl. Punkt 2.1.2.2.) wurden zwei neueren Datums untersucht:

	mg/100 ml Tropfen	
	Syringin	Syringenin- apiosylglucosid
Asgoviscum ^R Fa. Birkenweg Ch.-B. 582/5 (1985)	5,9	8,3
Asgoviscum forte ^R Ch.-B. AP 036' (08.84)	3,95	5,5

Tab. 14: Gehalt an Phenylpropanverbindungen in den Fertigpräparaten Asgoviscum^R und Asgoviscum forte^R

Da nach unseren Untersuchungen in 100 g getrockneter Droge je ca. 50 mg von beiden Phenylpropanen enthalten waren, erwarten wir im Fertigarzneimittel je etwa 7,5 mg pro 100 g bzw. 7,35 mg pro 100 ml (lt. Deklaration enthalten 100 g Tropfen 75 g Tinct. (1:5) Visci albi; die Dichte wurde mit 0,98 bestimmt). Die errechneten Werte lagen, wie Tab. 14 zeigt, nur geringfügig darunter.

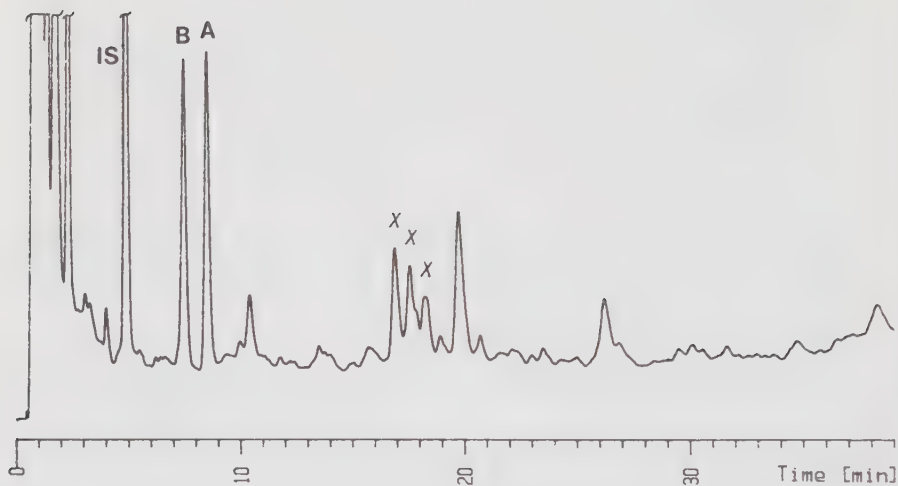


Abb. 20: HPLC-Chromatogramm von Asgoviscum forte^R,
Ch.-B. AP 036; Trennsystem TS-2, s: Exp. Teil

A : Syringeninapiosylglucosid

B : Syringin

IS: Interner Standard Resorcin

2.1.2.2. Untersuchung mehrerer Chargen unterschiedlicher Lagerungszeit

	Ch.-B.	Herst.-Datum	mg/100 ml Tropfen	
			Syringin	Syringenin- apiosylglucosid
A.	EM 917	(12.79)	0,6	1,3
A.	HS 935	(05.81)	0,6	2,7
A.	UU 950	(02.82)	2,0	4,5
A.	SL 962	(01.83)	3,4	6,6
A. Fa.	Birkenweg	(? .85)	5,9	8,3
A.f.	UI 1586	(02.80)	2,5	3,2
A.f.	US 1609	(02.81)	3,2	4,1
A.f.	OS 1629	(06.81)	10,7	8,9
A.f.	AU 027	(08.82)	9,4	7,5
A.f.	AP 036	(08.84)	4,0	5,5
A. = Asgoviscum ^R				
A.f. = Asgoviscum forte ^R				

Tab. 15: Asgoviscum^R -Chargen verschiedener Lagerungszeit.
Angabe sind die Mittelwerte aus mindestens drei Bestimmungen.

Ein Vergleich verschiedener Chargen von Asgoviscum^R liquid. läßt erkennen, daß mit zunehmender Lagerungszeit (unter nicht standardisierten Bedingungen) der Gehalt an beiden Phenylpropanen deutlich abnimmt. Bei den Asgoviscum forte^R-Chargen korreliert die Höhe der Gehalte dagegen nicht streng mit der Lagerzeit.

In den Chromatogrammen beider Spezialitäten Asgoviscum^R und Asgoviscum forte^R (s. Abb. 20) erschien bei Rt = 19,7 min jeweils ein Peak, der weder aus dem Mistelfingerprint noch

aus einem anderen Drogenbestandteil des Präparates stammte. Dieser Peak war jedoch auch in den untersuchten Viscum-Tinkturen vorhanden. Wir konnten ihn aber nicht zuordnen. Die drei Signale im Bereich von $R_t = 16,9$ bis $18,5$ min stammen aus dem Mistelfingerprint ("x").

2.2. Nachweis und Analyse weiterer Bestandteile von Asgoviscum forte^R

In Asgoviscum forte^R sind neben einem wäßrig-alkoholischen Mistelauszug folgende Zusätze enthalten:

Fruct. Crataegi oxyac. et monog.

Bulb. Allii sat.

Rad. Rauwolfiae serp.

Hydroxymethylrutin

Zimtöl (Geschmackskorrigens)

Im folgenden sollte gezeigt werden, ob sich im Fingerprint der Spezialität Signale dieser Zusätze nachweisen lassen. Rauwolfiae serp. rad. sollte über HPLC nachgewiesen werden.

2.2.1. Crataegi fructus

Der Butanolextrakt von Crataegi fructus zeigte in der HPLC (Trennsystem T1) einen Hauptpeak bei $R_t = 14,3$ min. Dem UV-Spektrum nach handelt es sich hier um ein Phenolderivat, aber kein Flavonoid. Der Peak läßt sich weder im Chromatogramm von Asgoviscum^R oder Asgoviscum forte^R, noch in der Analyse von Tinct. Visci albi cum Crataegi wiederfinden. Vermutlich liegt die Ursache in dem im Vergleich zu Viscum album wesentlich geringeren prozentualen Drogenanteil (ein Zehntel).

Crataegus-Drogen wurden bereits mittels HPLC über den Flavonoidgehalt bestimmt (115,116,117). In einer Mischung mit Viscum album, besonders in dem vorliegenden Mengenverhältnis, überlagern sich die Flavonoide beider Drogen und können nicht mehr zugeordnet werden. Die Flavonoidfingerprint-Analyse von Asgoviscum^R ist auf S.85 besprochen.

Der Nachweis von Crataegi fructus dürfte hier besser über die oligomeren Procyanidine möglich sein (118,119,120), da diese in der Frucht höher konzentriert vorliegen.

2.2.2. Allii sativi bulbus

Der Knoblauchextrakt ist nur in sehr geringer Menge in Asgoviscum enthalten (0,18 g pro 100 ml). Wir führten diesbezüglich keine DC- und HPLC-Untersuchung durch, da nachweisbare Inhaltsstoffe des Knoblauchs in dieser geringen Konzentration kaum zu erwarten waren.

Eine quantitative Bestimmung des Alliins aus Droge und Öl mittels HPLC wurde von MIETHING (121) ausgearbeitet. Nach der älteren Methode von MICHAELLES (122) wird das Alliin nach dünnschichtchromatographischer Abtrennung und Umsetzung photometrisch erfaßt. Die sich vom Alliin ableitenden schwefelhaltigen Umsetzungsprodukte, die an der pharmakologischen Wirkung beteiligt sind, wurden von VOIGT und WOLF über HPLC bestimmt (165).

2.2.3. Zimtöl

Das als Geschmackskorrigens zugesetzte Zimtöl besteht hauptsächlich aus ca. 70 % Zimtaldehyd sowie 5 - 11 % Eugenol und Zimtsäure (123,124).

Diese lipophilen Verbindungen stören nicht bei der Bestimmung der Phenylpropane, da sie im Trennsystem T2 ganz am Schluß eluieren (ab 38 min). Mit einem höheren Anteil Acetonitril im Laufmittel (bis 95 %) konnten wir eine Trennung erreichen.

2.2.4. Hydroxymethylrutin

Dieser Zusatz stellt ein Gemisch aus Mono-, di- und tri-hydroxymethylrutin dar.

Wir konnten diese Mischung weder über DC noch über HPLC zur Auftrennung bringen. Sie verblieb jeweils am Start, ohne sich eluieren zu lassen. Wie sich herausstellte, entsprach die Zusammensetzung des Gemisches nicht der Deklaration.

Die HPLC-Trennung eines Gemisches aus Mono-, di-, tri- und tetrahydroxyethylrutin ist bereits in der Literatur beschrieben (125,126). Wir konnten die Methode ohne Schwierigkeiten auf eine LiChrospher 100 CH 18/2-Säule übertragen.

2.2.5. Rauwolfiae serpentinae rad.

Hauptinhaltsstoffe dieser Droge sind Reserpin, Ajmalin, Raubasin und Rescinnamin, Serpentin kommt nur in relativ geringer Menge vor (123).

Zur DC-Auftrennung wird dem Laufmittel zur Zurückdrängung der Dissoziation eine Base (z. B. Diphenylamin) (57,127) zugesetzt. In der HPLC lassen sich die freien Alkaloide auf RP-Material ebenfalls nach Alkalisieren des Laufmittels trennen (z. B. Zusatz von Ammoniumcarbonat). Die elegantere und für die Pumpenköpfe schonendere Methode ist die Ionenaarchromatographie. Das Laufmittel wird zur Protonierung des Alkaloid-Stickstoffs angesäuert (z. B. mit Essigsäure). Die dem Laufmittel eben-



Abb. 21: HPLC-Chromatogramm eines Rauwolfia-Extraktes,
Chromatogr. Parameter s. Exp. Teil

falls zugesetzte Heptansulfonsäure (Pic B7-Reagens, Fa. Waters), bildet mit den Alkaloidkationen Ionenpaare, die über RP-HPLC aufgetrennt werden können (128-132).

Mit dieser Methode konnten wir Reserpin und Rescinnamin sowohl im Rauwolfia serp.-Trockenextrakt (wird für die Herstellung verwendet) als auch im Präparat Asgoviscum forte^R qualitativ nachweisen. Die Identität wurde durch Überspritzen mit den authentischen Vergleichssubstanzen sichergestellt. Die Probenaufbereitung und chromatographischen Parameter sind im Exp. Teil angegeben. Das Chromatogramm zeigt Abb. 21.

Ajmalin ist im Rauwolfia-Extrakt ebenfalls zu identifizieren, wird aber von den polaren Substanzen an der Laufmittelfront nicht sauber abgetrennt. Im Asgoviscum forte^R ist Ajmalin vollständig vom polaren Anteil überlagert. Zur quantitativen Gesamtbestimmung der Alkaloide kann das photometrische Verfahren nach DAB 8 (133) angewendet werden.

3. Analyse weiterer mistelhaltiger Fertigpräparate

Der Nachweis des Mistelfingerprints erfolgte durch HPLC-Analyse der Butanolfraktionen der jeweiligen Spezialitäten. Zur quantitativen Bestimmung der Phenylpropanderivate müssen sowohl die Probenaufbereitung als auch der Innere Standard den jeweiligen Gegebenheiten angepaßt und optimiert werden.

Die Zusammensetzung der einzelnen Fertigpräparate ist im Exp. Teil, S. 131 angegeben.

Die zuerst untersuchten Präparate enthielten nur Viscum album (I). Die nächsten Präparate setzten sich aus den Hauptanteilen Viscum und Crataegus zusammen (II). In den Spezialitäten der dritten Untersuchungsreihe lag ein Mistelextrakt kombiniert mit einer Vielzahl anderer Drogenextrakte vor (III).

(I)	(II)	(III)
Kneipp ^R Saft, Drg.	Craviscum ^R liquid.	Jumistan ^R liquid., Kps.
Viscysat Bürger ^R liquid.	Tonoplatin ^R liquid.	Verus ^R liquid.
Plenosol ^R *	Salus ^R Kps.	
	Viscolind P ^R Drg.	

Tab. 16: Untersuchte Fertigpräparate

* Der Primärextrakt wurde uns freundlicherweise von der Firma Madaus zur Verfügung gestellt.

Zur Orientierung trennten wir die Butanolfraktionen als erstes über DC im Laufmittel $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O}$ (70:30: 4) auf. In Tab. 17 ist angegeben, ob und wie deutlich die Phenylpropanverbindungen in den jeweiligen Spezialitäten nachweisbar waren. Zum Teil waren die Zonen durch gelbgefärbte Substanzen überlagert, so daß kein eindeutiger Nachweis möglich war. In diesen Fällen konnte die HPLC der Butanolfraktionen Klarheit schaffen (Abb. 22 bis 24).

Substanz	B	A
Spezialität	Syringin	Syringenin- apiosylglucosid
Kneipp Mistel-Pflanzensaft ^R	++	++
Kneipp Mistel-Dragees ^R	+	++
Viscysat Bürger ^R liquid.	+	(+)
Plenosol ^R	-	++
Craviscum ^R liquid.	++	(+)
Tonoplantin ^R liquid.	+	-
Salus Kreislauf-Stärkungs-Kapseln ^R	++	+
Viscolind P ^R Dragees	+	+
Verus ^R liquid.	+	+
Jumistan ^R Kapseln	++	+
Jumistan ^R liquid.	+	+

Tab. 17: Nachweis der Phenylpropanverbindungen über DC

++	deutliche Zone
+	schwache Zone
(+)	wegen Überlagerung von Zonen nicht sicher
-	nicht vorhanden

3.1. Kneipp Mistel-Pflanzensaft^R und Kneipp Mistel-Dragees^R
(Abb. 22 a,b)

Bei der DC-Analyse konnte in allen vier Auszügen (jeweils zwei Chargen Saft und Dragees) der Drogenfingerprint mit Syringin und Syringeninapiosylglucosid als den Hauptzonen wiedergefunden werden. Den besten Fingerprint lieferten die Pflanzensäfte (s. Abb. 12).

In der HPLC-Analyse entsprachen beide Pflanzensäfte (Abb. 22a) dem Elutionsprofil der pulverisierten Droge. Eleutherosid E wurde zusammen mit Substanz (Z) und nicht als separater Peak eluiert.

Die Fingerprintanalyse der Dragees (Abb. 22b) wird durch Tablettier- und Dragierhilfsstoffe gestört. Man kann aber auch hier das "Mistel-Profil" erkennen. Bemerkenswert ist, daß bei $R_t = 5,5$ min ein Peak mit gleichem UV-Spektrum wie Syringin erscheint, der mengenmäßig dominiert. Es dürfte sich hier um ein mit Syringin verwandtes Phenylpropanderivat handeln, möglicherweise eine Verbindung mit einem anderen Zuckerrest.

3.2. Viscysat Bürger^R liquid. (Abb. 22c')

Obwohl in diesem Präparat nur *Viscum album* Preßsaft enthalten ist, erschienen in der HPLC der Butanolausschüttelung zusätzlich zu den Peaks des Mistelfingerprints weitere Signale. Die Phenylpropane A und B sowie alle mit "x" gekennzeichneten Peaks, die dem Fingerprint der Mistel entsprachen, waren vorhanden. Eleutherosid E entsprach nach der Retentionszeit dem mit x_c bezeichneten Signal. Ein UV-Spektrum konnte hiervon wegen der geringen Peakhöhe nicht aufgenommen werden. Aufgrund der veränderten Konzentrationsverhältnisse der Peaks B und A (hier etwa 1:2) war zu vermuten, daß bereits ein Abbau der Substanzen begonnen hatte.

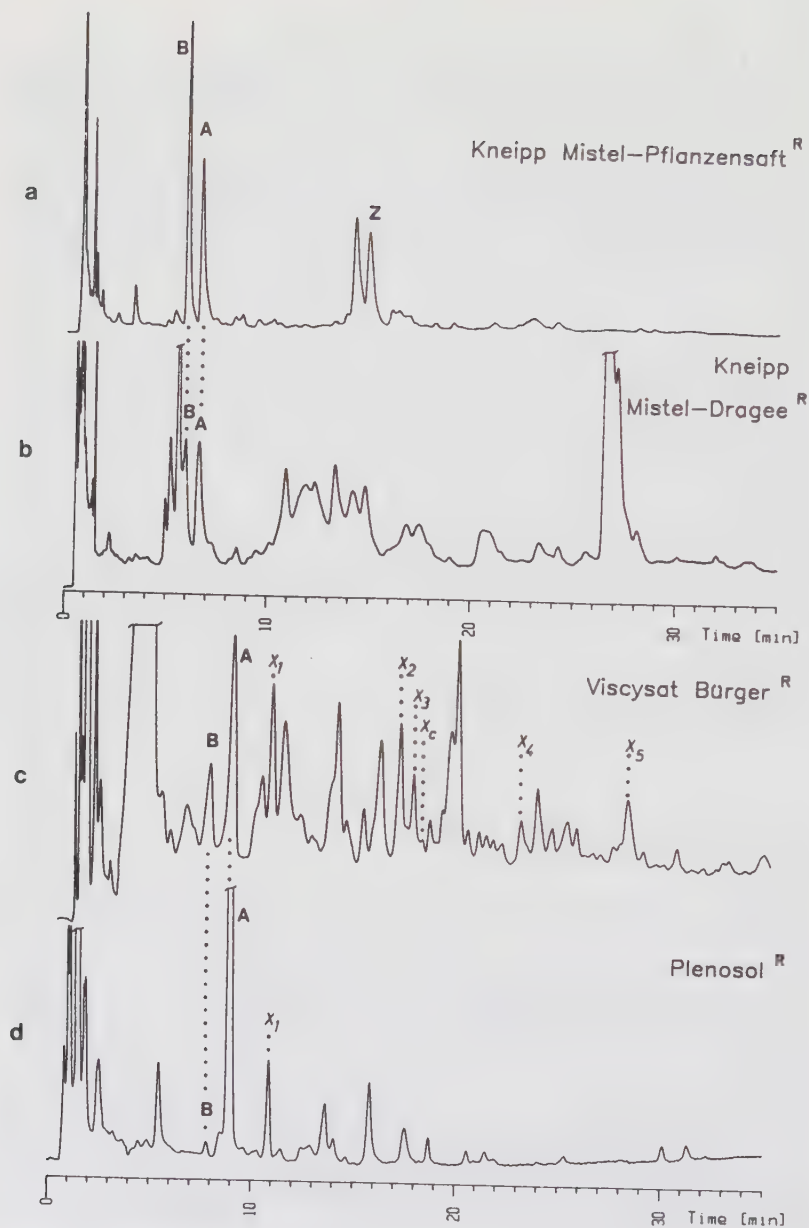


Abb. 22: HPLC-Chromatogramme von Fertigpräparaten,
Trennsystem TS-1 (s. Exp. Teil)

Die zahlreichen mit dem Mistelfingerprint nicht in Einklang zu bringenden Signale können ebenfalls mit einer beginnenden Zersetzung der Lösung erklärt werden. Die untersuchte Charge war zum Zeitpunkt der Analyse bereits 2 1/4 Jahre lang gelagert (134).

3.3. Plenosol^R

(Abb. 22 d)

Die Hauptverbindung dieses Primärextraktes stellt Syringeninapiosylglucosid - Peak A - dar. Syringin (B) war praktisch nicht mehr nachweisbar. Dies deutet auf eine vollständig durchgeführte Milchsäuregärung, wie sie bei den Iscador^R-Gärsäften bereits beschrieben wurde. Peak x₁ stammt aus dem Fingerprint der Droge. Eine quantitative Bestimmung der Substanz A ist analog den Iscador^R-Präparaten möglich. Bisher wird der verdünnte Extrakt am Kaninchen auf Nekrose-Einheiten standardisiert und auf drei Stärken eingestellt.

3.4. Craviscum^R liquid.

(Abb. 23 a)

Dieses Präparat enthält Extrakte von Crataegus und Viscum album im Verhältnis 1:2. Die Hauptverbindungen sind wieder A und B, Peak x_c dürfte Eleutherosid E entsprechen. Die mit "x" gekennzeichneten Zonen stammen wieder aus dem Mistelfingerprint. Das Mengenverhältnis von B zu A stimmt etwa mit dem des Mistelextraktes überein.

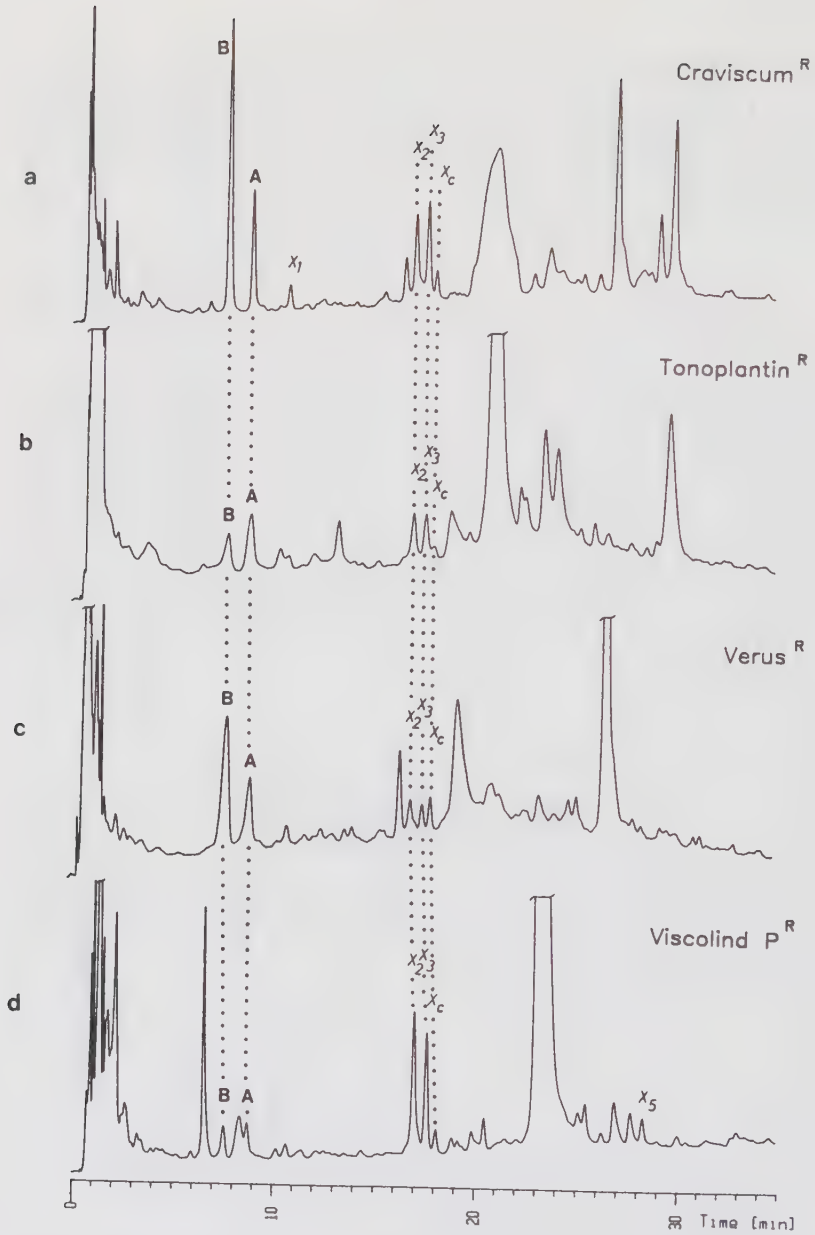


Abb. 23: HPLC-Chromatogramme von Fertigpräparaten,
Trennsystem TS-1 (s. Exp. Teil)

3.5. Tonoplantin^R liquid.

(Abb. 23 b)

Bei dieser Spezialität liegt der Weißdornextrakt in höherer Konzentration als der Mistelextrakt vor (Verhältnis 3:2). Die Hauptverbindungen A und B ließen sich nur schlecht nachweisen. Die mit "x" bezeichneten Peaks gehören zusätzlich zum Fingerprint der Droge *Viscum album*. Die relativ kleine Menge von B im Vergleich zu A deutet auf einen teilweisen Abbau dieser glykosidischen Verbindungen hin. Die untersuchte Charge war zum Zeitpunkt der Analyse 15 Monate lang gelagert (134).

3.6. Salus Kreislauf-Stärkungs-Kapseln^R

(Abb. 24 a)

Bei diesem Weißdorn-Mistel-Kombinationspräparat (Verhältnis 2:1) lassen sich wieder deutlich die Phenylpropanverbindungen A und B etwa im ursprünglichen Mengenverhältnis detektieren.

3.7. Viscolind P^R Dragees

(Abb. 23 d)

Obwohl die untersuchte Charge zum Zeitpunkt der Analyse bereits 12 (!) Jahre alt war, konnten wir in dieser immer noch charakteristische Bestandteile der Mistel nachweisen: A und B, nur noch in geringer Menge enthalten, entsprachen in ihren UV-Spektren genau den isolierten Verbindungen. Mit "x" bezeichnete Peaks des Mistelfingerprints konnten wir einschließlich Eleutherosid E (x_c) deutlich wiedererkennen. Die feste Arzneiform Dragee scheint demnach gegenüber Abbaureaktionen ziemlich stabil zu sein.

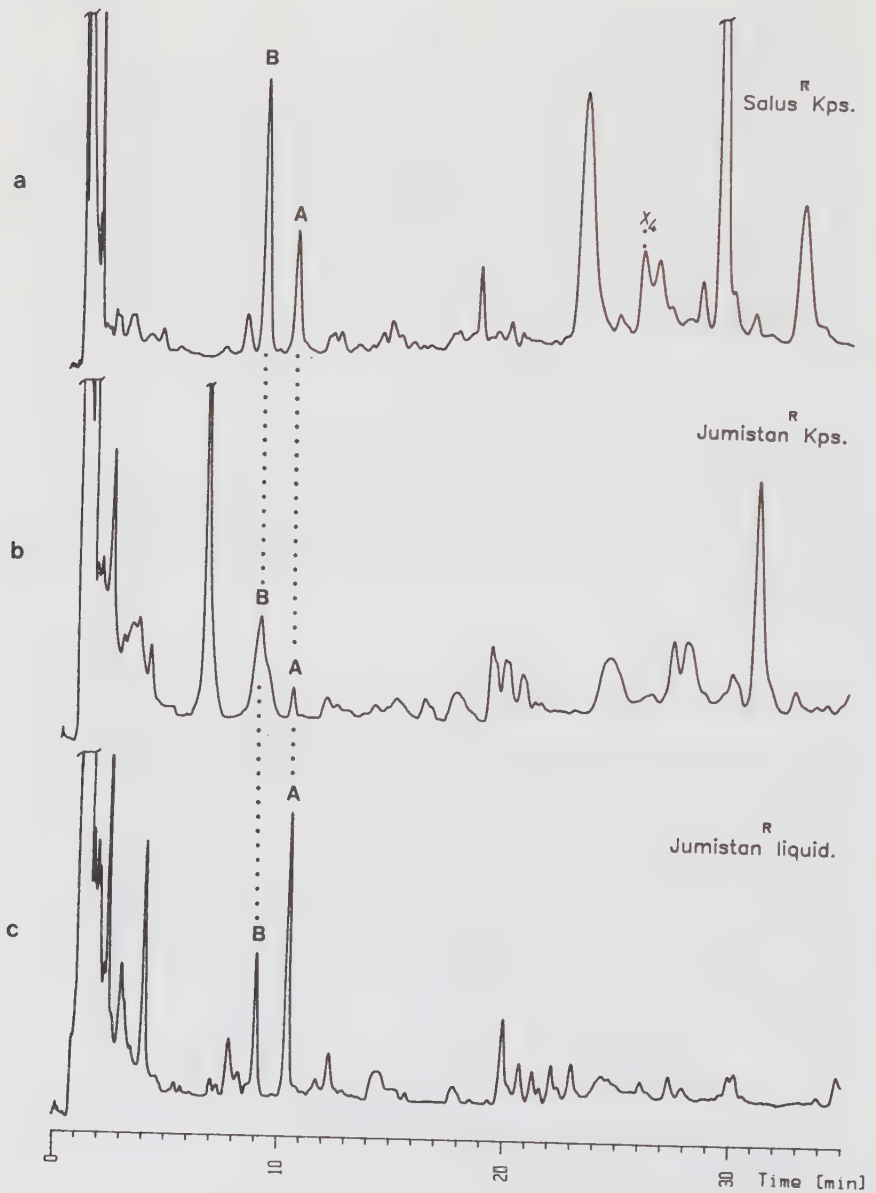


Abb. 24: HPLC-Chromatogramme von Fertigpräparaten,
Trennsystem TS-1 (s. Exp. Teil)

3.8. Verus^R liquid.

(Abb. 23 c)

In Verus^R liquid. ist Viscum album mit sechs anderen Drogen kombiniert, die Flavonoide, Herzglykoside bzw. etherische Öle enthalten. Auch hier stellt das Phenylpropan-Paar A und B in der Butanolfraction die charakteristischen Verbindungen dar. Sie konnten ebenso wie die Peaks x_2 , x_3 und x_c (x_c = Eleutherosid E) aus dem Mistelfingerprint über die on-line aufgenommenen UV-Spektren zweifelsfrei zugeordnet werden.

3.9. Jumistan^R Kapseln und liquid.

(Abb. 24 b,c)

Jumistan^R besteht aus 9 bzw. 16 Drogenbestandteilen. Trotzdem waren in den Tropfen die Substanzen A und B eindeutig nachzuweisen. Aufgrund des umgekehrten Konzentrationsverhältnisses von A und B vermuten wir, daß ein teilweiser Abbau der Verbindungen stattgefunden hat. In den Kapseln waren A und B erst durch Detektion mit dem Photodiodenarray sicher zu identifizieren.

IV. Untersuchung der Flavonoide von Viscum album L.

Da Flavonoide in der Mistel beschrieben worden sind (42 - 48), prüften wir, ob auch ein entsprechender Flavonoid-Fingerprint zur Charakterisierung herangezogen werden kann. Die Untersuchung von BECKER und EXNER (44 - 46) beschränkte sich allerdings auf die Flavonoidaglyka, da sich die Glykosidzusammensetzung als sehr komplex herausgestellt hatte. Sie fanden in den hydrolysierten Extrakten Quercetin-Derivate, die sich durch unterschiedliche Methoxylierung in 3-, 7- und 3'-Stellung unterschieden. Aus der zur Unterfamilie der Loranthoidae gehörenden Riemenmistel, *Loranthus europaeus* L., isolierten sie drei Flavonolglykoside: Rhamnocitrin-3-O-rhamnosid, Rhamnetin-3-O-glucosid und Rhamnetin-3-O-rhamnosid (48).

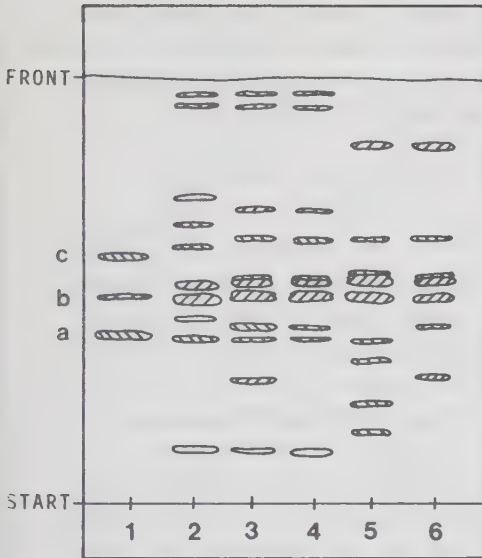
Über den Gesamtflavonoidgehalt in *Viscum album* macht EXNER (46) folgende Angaben:

- Der Gesamtflavonoidgehalt beträgt 0,25 bis 0,3 %.
- Der Flavonoidgehalt ist jahreszeitlich verschieden.
- Der Flavonoidgehalt in den einzelnen Pflanzenteilen ist unterschiedlich: die Blätter zeigen den höchsten Gehalt, Blüten- und Stengelteile enthalten weniger Flavonoide.

1. Untersuchung der Droge

1.1. Dünnschichtchromatographie

Wir chromatographierten Mistelextrakte verschiedener Herkunft im Laufmittel EtOAc - AS - HOAc - H₂O (100:11:11:26). Detektiert wurde mit Naturstoff-Reagens und mit PEG nachbesprüht. Um schärfer abgegrenzte Zonen zu erhalten, chromatographierten wir auf HPTLC-Platten (s. Abb. 25).



Zuordnung:

- 1: Rutin (a), Chlorogensäure (b), Hyperosid (c)
- 2: Viscum album, Wirt: Pinus
- 3: Viscum album, Wirt: Malus
- 4: Viscum album, Wirt: Quercus
- 5: Viscum album, Wirt: Tilia
- 6: Viscum album, Fa. ICI

Det.: DC-D5 (Naturstoff-Reag.)

LM: DC-T9

 hellblau (UV-365 nm)

 orange (UV-365 nm)

 Minderung im UV 254 nm

Abb. 25: DC von Mistelextrakten verschiedener Herkunft

In allen Viscum-album-Drogen ließ sich als Hauptzone Chlorogensäure (b) mit einer ebenfalls blau fluoreszierenden Zone direkt darüber (andere isomere Caffeyolchinasäure) nachweisen. Weitere Phenolcarbonsäuren sind in geringerer Menge und wechselnder Zusammensetzung ebenfalls enthalten, z. B. Kaffeesäure im Frontbereich. Der Gehalt an flavonoiden Verbindungen ist nicht immer qualitativ gleich. Bei Viscum album "ICI" fehlte z. B. ein Fleck in Höhe des Rutins (a), bei Viscum album, Pini waren dagegen zusätzlich zwei gelbgrün fluoreszierende Zonen (Rf 0,45 und 0,7) und zwei rot fluoreszierende Substan-

zen bei Rf 0,65 zu finden. Der geschätzte Gehalt an Flavonoidglykosiden ist relativ gering. Aglyka konnten wir erst in den hydrolysierten Extrakten im LM DC-T10 nachweisen. Eine Trennung der Flavonoidaglyka aus *Viscum album* über Polyamid-DC, RP-8- und RP-18-DC wurde von EXNER (46,135) beschrieben.

1.2. HPLC

In einem Acetonitril-Wasser-Gradienten (TS-5, 2 % HOAc-Zusatz, RP-18 Säule) erhielten wir ein HPLC-Chromatogramm, in dem neben Chlorogensäure als Hauptpeak ($R_t = 4,0$ min) eine Vielzahl von Signalen im Bereich von 14 bis 28 min (vgl. (167)) erschien. Nach den on-line aufgenommenen UV-Spektren mußte es sich um Flavonolglykoside handeln. Der markanteste Peak in diesem Bereich bei $R_t = 16,9$ min zeigte abweichend dazu ein UV-Spektrum mit Maxima bei 273 nm und 328 nm. Hiernach dürfte es sich weder um ein Flavonol- noch um ein Flavanon(ol)-Derivat handeln.

Die Butanolfraction einer Mistel, die auf *Ulmus glabra* gewachsen war, lieferte ein weitgehend übereinstimmendes Elutionsprofil. Zusätzlich wurden aber Substanzen eluiert, die sich in den *Viscum*-Drogen anderer Herkunft nicht wiederfinden ließen. Sie sind ebenfalls der Klasse der Flavonolglykoside zuzuordnen.

Die Chromatogramme ließen sich allgemein in zwei Bereiche einteilen:

- Bereich der Pflanzensäuren von 0 bis ca. 10 min mit dem Hauptpeak der Chlorogensäure bei $R_t = 4$ min.
- Bereich der Flavonoide von 10 bis 30 min.

Die mit dem Photodiodenarray aufgenommenen UV-Spektren (vgl. Abb. 26) ließen folgende Interpretation zu (137,138): Zwei intensive Banden (I bei 350 bis 370 nm, II bei 250 bis 260 nm) deuteten auf das Vorliegen von Flavonen oder Flavonolen. Da Bande II eine Schulter bei ca. 270 nm aufwies, kamen nur Flavonole mit 3',4'-Substitution am Ring B in Frage, wie sie zum Beispiel Quercetinderivate aufweisen. Die geringen Unterschiede der einzelnen Flavonoid-UV-Spektren (bathochrome bzw. hypsochrome Verschiebung bis zu 10 nm, Differenzen in der Intensität) können durch Methylierung oder Glykosidierung verschiedener Hydroxylgruppen erklärt werden. Unsere Ergebnisse sind mit denen von BECKER und EXNER (44,45,46) im Einklang, die als Aglyka ebenfalls unterschiedlich methylierte Quercetinderivate gefunden hatten.

Die Chromatogramme der über SepPak-Kartuschen aufbereiteten Lösungen (vgl. II. 5.1.) von Misteln definierter Herkunft zeigt Abb. 26. Außer der Chlorogensäure (1) ($R_t = 4,0$ min) war in allen drei Chromatogrammen ein markanter Peak bei $R_t = 21,8$ min (7) nachweisbar, der nach dem UV-Spektrum von einem Flavonolglykosid stammen sollte. Wegen des verschieden starken Methoxylierungsgrades der Quercetinderivate konnten wir nicht in einen Aglykon- und Glykosidbereich unterteilen. Erst nach erfolgter Mikrohydrolyse mit 2N-TFA waren die frei vorkommenden Aglyka lokalisierbar. Im Chromatogramm von *Viscum album*, Mali sind alle Flavonolderivate mit "Q" bezeichnet, alle Aglyka mit "A". Da nach Hydrolyse mit 2N TFA besonders der Peak "A₅" hervortrat, dürften die meisten Glykoside von diesem methylierten Flavonolderivat stammen.

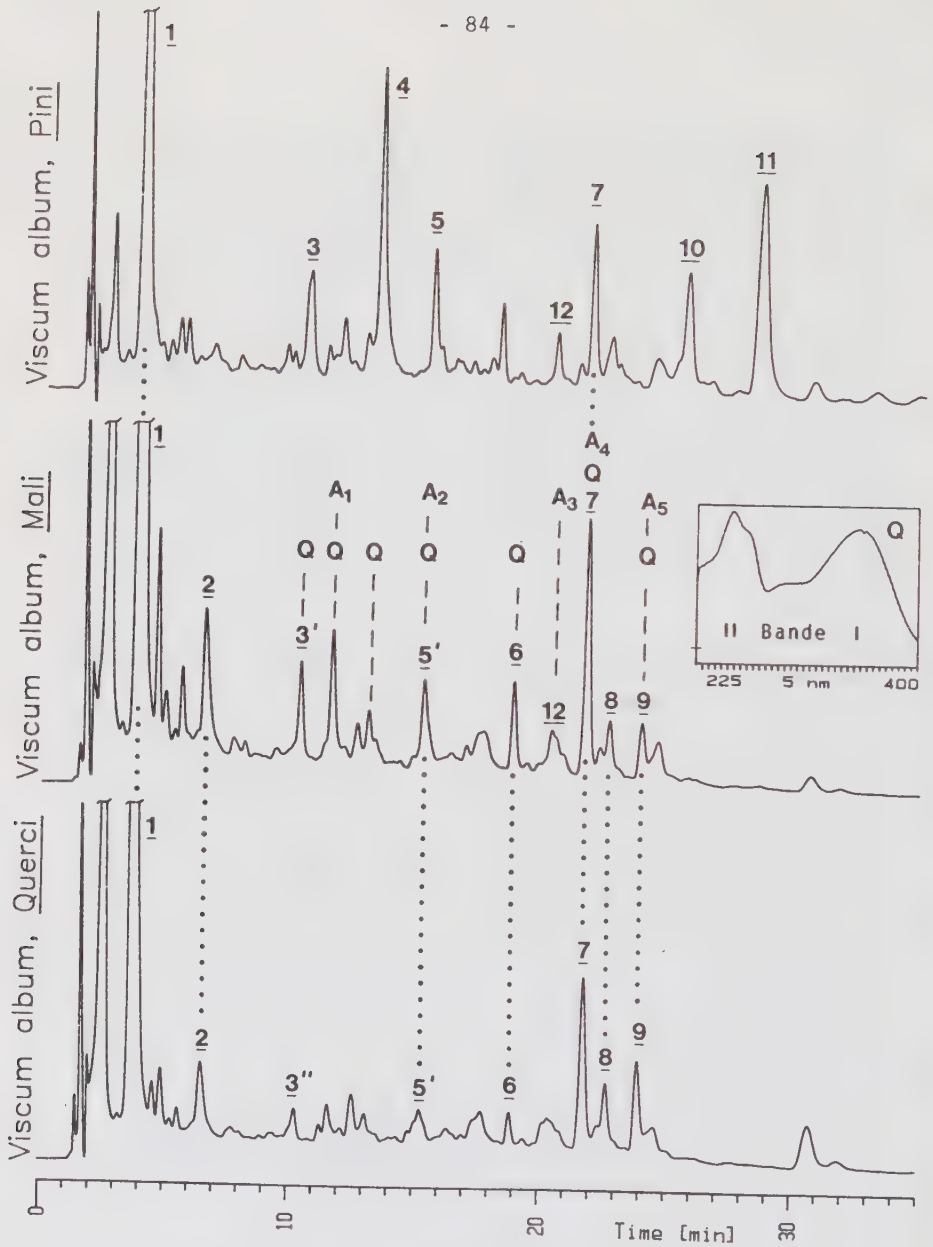


Abb. 26: HPLC-Flavonoid-Fingerprint der Drogenextrakte

- Q: UV-Spektrum eines Flavonols, wie abgebildet

- A: Aglykon

Trennsystem TS-5 (s. Exp. Teil)

2. Untersuchung der Frisch- und Gärsäfte

(Abb. 27)

In den HPLC-Analysen der **Frischsäfte** von *Viscum album*, *Mali* und *Querci*, war nur noch Peak 7 als deutliches Flavonoid-Signal enthalten. Bei *Viscum album*, *Pini* erschienen zusätzlich die Signale 4, 5 und 12. Da auch in den **Gärsäften** Peak 7 der flächengrößte ist, schließen wir daraus, daß es sich ebenfalls um ein Aglykon handelt. Auch Aglykon 12 ist enthalten. Beide liegen aber nur in sehr geringer Menge vor. *Viscum album*, *Pini* zeigt sowohl im Frisch- wie im Gärssaft zusätzlich noch weitere Peaks (3, 4, 5). Peak 4 und 5 zeigten das typische UV-Spektrum der Flavonole, Peak 3 konnten wir keiner Grundstruktur zuordnen.

3. Flavonoid-Fingerprintanalyse von Fertigpräparaten

Die Chromatogramme einiger Spezialitäten zeigt Abb. 28. In allen untersuchten Fertigpräparaten (Ausnahme: *Tonoplantin*^R) erhielten wir jeweils **einen** übereinstimmenden markanten Peak (7) bei $R_t = 23,8$ min. Wie den UV-Spektren, die die typischen Maxima und Minima der Flavonole aufwiesen, zu entnehmen war, entsprach das Signal dem Peak (7) aus den Elutionsprofilen der Droge bzw. den Frisch- und Gärsäften (vgl. Abb. 26 und 27).

Zwei weitere Peaks, die in allen Spezialitäten nachweisbar waren (Ausnahme: *Tonoplantin*^R), lagen bei $R_t = 17,0$ min (13) und $25,0$ min (14). Aufgrund der von Präparat zu Präparat variierenden UV-Spektren konnten wir feststellen, daß in den Spezialitäten verschiedene Substanzen gleiche Retentionszeiten aufwiesen. In den meisten Fällen waren sie nicht der Klasse der Flavonole zuzuordnen. Diese Signale können nicht als typisch für die Mistel angesehen werden.

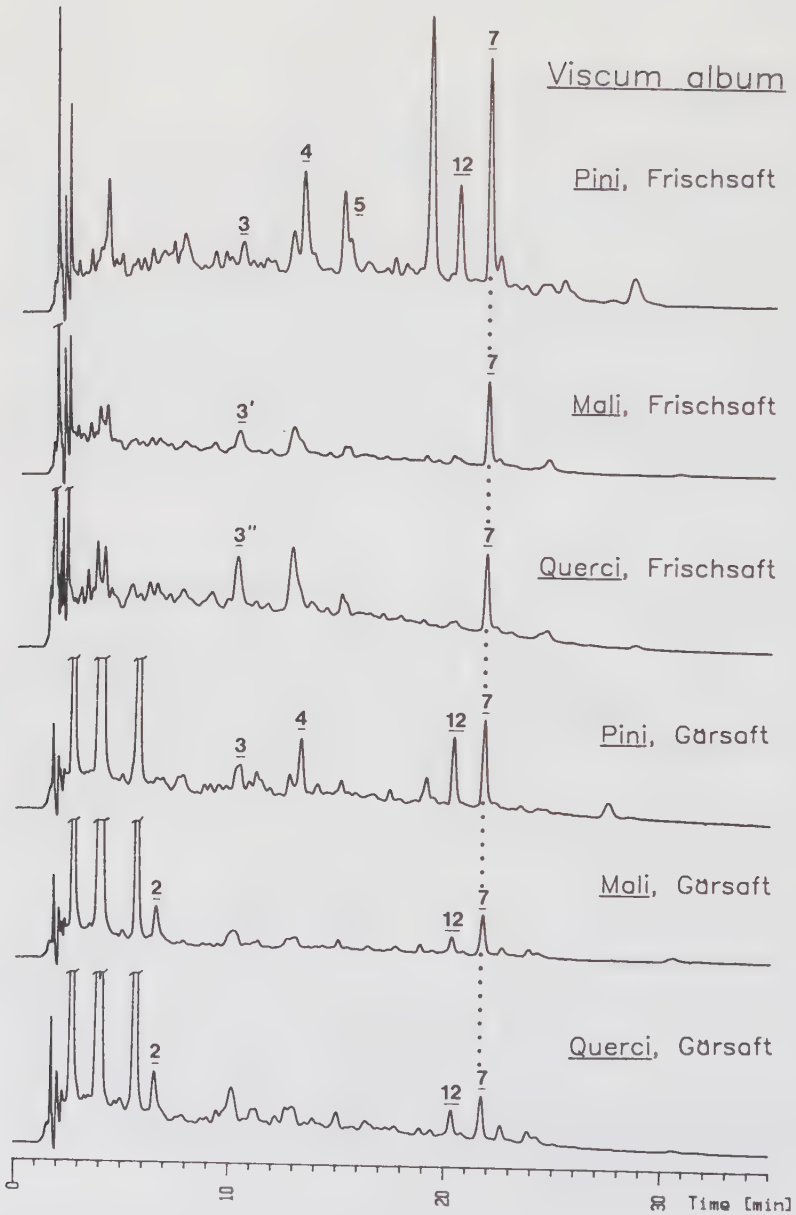


Abb. 27: HPLC-Chromatogramme der Frisch- und Gäräfte
- gleiche Zahlen: gleiche Retentionszeit
- verschiedene Indices: unterschiedliche UV-Spektren
Trennsystem TS-5 (s. Exp. Teil)

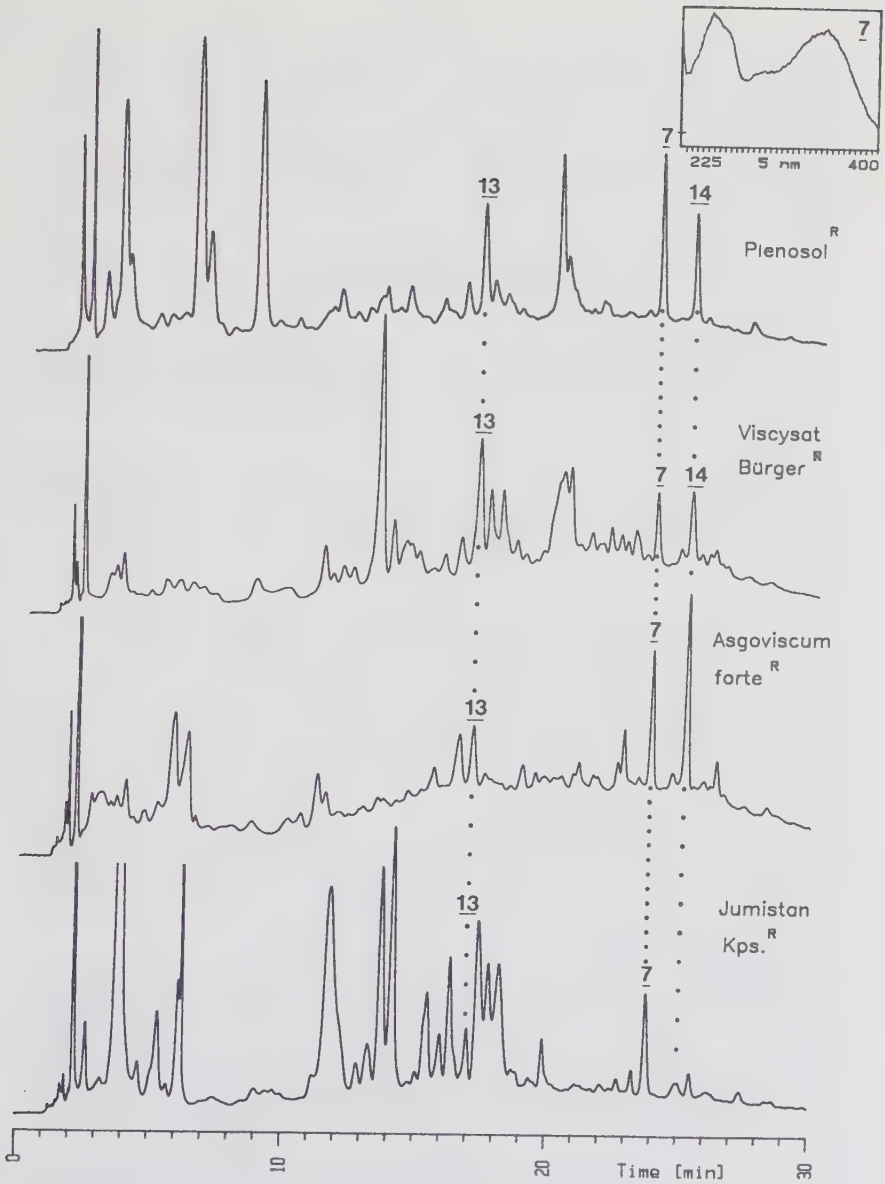


Abb. 28: Einige HPLC-Elutionsprofile der untersuchten Fertigpräparate
Trennsystem TS-5 (s. Exp. Teil)

Bereits reine Mistelextrakte liefern ein komplexes und nicht immer einheitliches Elutionsprofil. Da in Kombination mit anderen Drogen, wie z. B. Crataegus, der Nachweis von Viscum album nur an Hand eines **einzigen Signals** erbracht werden kann, halten wir die Flavonoid-Fingerprintanalyse als **alleinige Methode** zum qualitativen Nachweis für **nicht ausreichend**.

Eine quantitative Bestimmung der Droge über das Flavonoidmuster erscheint uns aus folgenden Gründen wenig geeignet:

- Der Gesamtflavonoidgehalt der Droge ist nicht hoch genug:
0,25 bis 0,30 % nach EXNER (46); zum Vergleich Crataegi fol.
c. fl. (115): 1,8 %.
- In Kombination mit anderen Drogen tritt der Flavonoid-Anteil der Mistel in den Hintergrund und kann nicht separat bestimmt werden.
- Da sich repräsentativ nur ein Signal bestimmen läßt, muß von einem theoretisch gleichbleibenden Verhältnis Glykosid zu Aglykon ausgegangen werden.
Diese Voraussetzung ist in Pflanzenextrakten nicht erfüllt, besonders nicht in Lösungen.
- Die von uns ausgearbeitete quantitative Bestimmung der Droge über die Phenylpropanderivate, erscheint uns zuverlässiger und zeigte wegen der hohen molaren Extinktion dieser Verbindungen höhere Empfindlichkeit.

Der **Gesamt-Flavonoidgehalt** einer aus mehreren Drogen zusammengesetzten Spezialität kann (und sollte) über das beschriebene Trennsystem bestimmt werden, nachdem festgestellt worden ist, welche Signale Flavonoiden zuzuordnen sind. Dies kann entweder über Isolieren der HPLC-Peaks mit anschließender DC oder (wesentlich zeitsparender, aber apparativ aufwendiger) über Detektion mit Hilfe des Photodiodenarrays erfolgen. Auf diese Weise kann ein "Flavonoid-Fingerprint" der gesamten Spezialität erhalten und eine gleichbleibende Zusammensetzung kontrolliert werden.

KAPITEL 3: Dimerisierungsreaktion der Phenylpropanderivate

Die zur Standardisierung der mistelhaltigen Phytopräparate verwendeten Phenylpropanderivate stellen die "Bausteine" der Lignane dar. Da laut Literatur (153,154) einige Lignane hypotensive Wirkung besitzen und potentielle Hemmer der Phosphodiesterase darstellen, wäre denkbar, daß auch die biosynthetischen Vorstufen dieser Lignane nach vorheriger Dimerisierung an der pharmakologischen Wirkung beteiligt sind. Diese Hypothese basiert auf der Beobachtung, daß Phenylpropanverbindungen unter zellmöglichen Bedingungen (Peroxidase-System, Katalyse durch Metallionen wie Fe^{+++}) leicht in die Lignanverbindungen umgewandelt werden können. Die Kenntnis der Bedingungen, die die Dimerisierungsreaktion begünstigen, wäre auch für die Einschätzung der Haltbarkeit von flüssigen Mistelzubereitungen von Bedeutung.

I. Reaktionsmechanismus der Dimerisierungsreaktion

Nach ersten Versuchen von COUSIN und HERISSEY (139) untersuchte ERDTMAN (140,141) die Dimerisierung von Ioeugenol. Da er bei der Dimerisierungsreaktion in erster Linie C8-O-C8-verknüpfte Produkte erhielt, postulierte er einen radikalischen Reaktionsmechanismus.

Ausführliche Untersuchungen über das Lignin und seine Bausteine, z. B. Sinapinalkohol, stammen von FREUDENBERG und Mitarbeiter (142-150). Bei dem Versuch, aus Syringin über enzymatische Hydrolyse (Emulsin, ohne O_2 -Ausschluß) den Sinapinalkohol zu gewinnen, erhielten sie Dimer- und Polymerprodukte (149,150). Die dem Pinoresinol analoge Verbindung (aus dem Coniferylalkohol entstanden) nannten sie Syringaresinol, das auch bei Umsetzung des Sinapinalkohols mit Laccase/ O_2 oder CuSO_4/O_2 erhalten werden konnte.

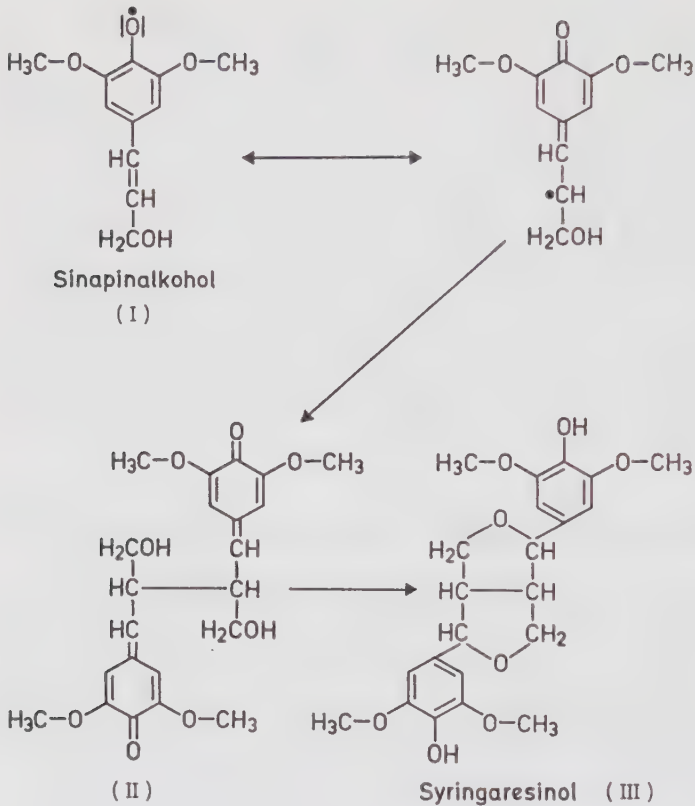
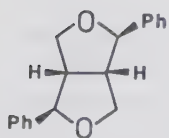


Abb. 29: Oxidative Dimerisierung von Sinapinalkohol

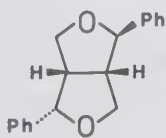
Das aus dem Sinapinalkohol über homolytische Abspaltung eines Wasserstoffatoms entstehende Radikal (I) wird sowohl über das phenolische System als auch über die Seitenkette mesomeriestabilisiert. Das Zwischenprodukt (II), das durch die Anlage zweier Radikale über β - β -Verknüpfung entsteht, reagiert anschließend über zweifachen Ringschluß zum Syringaresinol (III) weiter (siehe Abb. 29).

Die planare radikalische Verbindung I wird erst im Augenblick der Reaktion optisch aktiv, wobei eine (+)- und eine (-)-Form entstehen kann. Die Zwischenstufe (II) ist ein aus zwei (+)- oder zwei (-)-Formen zusammengesetztes racemoides Produkt. Wäre es mesoid, könnte später nur ein Tetrahydrofuran-Ring geschlossen werden, während der zweite offen bleiben müßte.

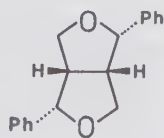
Beim Ringschluß zum Syringaresinol (III) entsteht das Gerüst des Dimethylolbernsteinsäuredilactons, das zwei neue Asymmetriezentren besitzt. Je nach räumlicher Anordnung der beiden Phenylringe handelt es sich um das Syringaresinol (III), das Epi-Syringaresinol (Lirioresinol A) (IV) oder das Dia-Syringaresinol (Lirioresinol C) (V), siehe Abb. 30. Aufgrund der jeweiligen (+)- und (-)-Formen (Enantiomere) existieren also sechs Stereoisomere. Angaben zur Stereochemie finden sich auch bei DICKEY (108), JOLAD und Mitarbeiter (107) sowie bei MacRAE (106).



(III)



(IV)



(V)

Abb. 30: Diastereomere des Syringaresinols

Prinzipiell könnten die mesomeriestabilisierten Radikale (I) in jeder möglichen Grenzform miteinander reagieren. Dadurch kann eine unüberschaubar große Anzahl von Produkten einschließlich Polymerverbindungen gebildet werden. Dies ist bei der Kondensation des Coniferylalkohols zu Dehydrodiconiferylalkohol und zum Coniferenlignin verwirklicht. Da bisher kein natürliches Lignin, das nur aus Syringyleinheiten aufgebaut ist, gefunden wurde, und da sich Sinapinalkohol im Vergleich zu Coniferylalkohol nur in geringerer Rate zu einem Mischpolymerisat umsetzen läßt, scheinen andere als β - β -Verknüpfungen beim Sinapinalkohol sterisch erschwert zu sein (143).

Obwohl YAMASAKI (151) durch ein Peroxidase/Hydrogenperoxid-System reines Syringyl-Polymer erhalten konnte, dürfte in der Pflanze mengenmäßig bevorzugt die β - β -Kopplung zum Syringaresinol stattfinden.

II. Schlußfolgerungen

Da aus den nicht glykosidierten Phenylpropanverbindungen leicht radikalische Produkte entstehen, lassen sich die "freien" phenolischen Verbindungen (Sinapinalkohol, Coniferylalkohol) in der Pflanze kaum nachweisen (152). So konnten auch wir nur das Glucosid bzw. Apiobiosid des Sinapinalkohols in der Droge identifizieren, nicht dagegen den freien Sinapinalkohol.

Solange die 4-Hydroxylgruppe durch Glykosidierung geschützt ist, können keine Radikale und somit keine Dimerprodukte entstehen. Die für die Standardisierung verwendeten Phenylpropan-Glykoside zeichnen sich also bei neutralem pH-Wert durch gute Stabilität aus, weshalb wir sie auch in älteren Fertigpräparaten noch nachweisen konnten. Im sauren pH-Bereich oder bei Anwesenheit von Glykosidasen können die Zucker dagegen abgespalten werden und die Phenoloxidation kommt so-

fort in Gang. Zur Stabilität in flüssigen Präparaten (wäßrig-alkoholische Extrakte) muß also auf einen neutralen, auf keinen Fall sauren pH-Wert geachtet werden, der die Glykosidspaltung begünstigen würde.

Nach oraler Anwendung von Mistel-Tees oder -Extrakten werden im Magen-Darm-Trakt die Zucker der Phenolglykoside abgespalten, wie dies z. B. auch bei Salicin oder den Herzglykosiden der Fall ist. Durch Oxidation könnten sie anschließend in die (pharmakologisch aktiven) Lignane wie das Syringaresinol umgesetzt werden. Falls diese Hypothese richtig ist, wären die in der Mistel enthaltenen Phenylpropanverbindungen als sog. Prodrugs zu bezeichnen.

KAPITEL 4: Pharmakologische Untersuchungen

Da aus der Literatur bekannt war, daß das aus der Mistel isolierte Lignanglucosid Eleutherosid E ein aktiver Hemmstoff der cAMP-Phosphodiesterase (PDE) (154) ist und auf der anderen Seite das ebenfalls PDE-hemmende Lignan Pinoresinol und seine Glucoside im Tierversuch eine hypotensive Wirkung entfaltet hatten (155), war es naheliegend, die mit den Lignan- und Phenylpropanverbindungen angereicherten Mistelfractionen ebenfalls auf mögliche cAMP-PDE-Hemmwirkung zu testen.

Obwohl für die biosynthetischen Vorstufen der Lignane, die Phenylpropanverbindungen, eine solche Wirkung bisher nicht beschrieben worden ist, wäre es vorstellbar, daß Verbindungen dieses Typs im menschlichen Organismus durch oxidative Dimerisierung in die pharmakologisch aktiven Lignanverbindungen umgewandelt werden können. Der Nachweis von Lignanverbindungen im Urin des Menschen (173) könnte für einen derartigen Metabolisierungsmechanismus sprechen, wobei ungeklärt ist, ob diese Lignane aus exogen zugeführten Vorstufen (Nahrung) stammen oder Produkte des körpereigenen Stoffwechsels sind.

I. cAMP-Phosphodiesterase-Hemmtest

Die Phosphodiesterase, deren Aktivität im Test gemessen wird, ist in fast allen Geweben von Säugern enthalten und katalysiert die nicht reversible Hydrolyse der 3'-Bindung des zyklischen Nucleotids zur nicht-zyklischen 5'-Monophosphat-Form. Durch Stimulierung oder Hemmung der Enzymaktivität können im Körper die Konzentration von cAMP und damit die Folgereaktionen (second messenger!) beeinflußt werden. Durch Hemmung der Phosphodiesterase kann z. B. über eine Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration eine Steigerung der Kontraktionskraft des Herzens bewirkt werden (156,162).

Bei einigen Krankheiten, wie z. B. Hypertonie und Diabetes hat man einen zu niedrigen cAMP-Spiegel, bedingt durch eine erhöhte Phosphodiesteraseaktivität, gemessen. Viele Hormone wirken über den gleichen "Vermittler" cAMP.

Bekannte PDE-Hemmstoffe sind z. B. Papaverin, Theophyllin (allg. Purine), Diazepam, Dipyridamol und Ocytocin, die alle eine starke physiologische Wirkung besitzen.

II. Pflanzliche Phenole und Lignane als Hemmstoffe der cAMP-Phosphodiesterase

Bisher sind zahlreiche, natürlich vorkommende, phenolische Verbindungen (Flavonoide, Xanthone, Lignane, Phenole) auf ihre Aktivität im PDE-Hemmtest untersucht worden (106,154,155,158, 159,160).

Bei den **Flavonoiden** waren die Flavone und Flavonole am stärksten wirksam, und hier wiederum die Aglyka, wie z. B. Quercetin. Nach Methylierung der Hydroxylgruppen war eine Abnahme der Hemmwirkung feststellbar (158-161).

Die z. T. ausgeprägte Hemmwirkung einiger **Lignan**-Verbindungen gibt Tab. 18 wieder.

Durch Einsatz des Phosphodiesterase-Hemmtests wurden z. B. in Extrakten von Forsythia suspensa die Lignane Pinoresinol und Pinoresinol- β -D-glucosid als aktive Prinzipien aufgefunden (154). Pinoresinol und Pinoresinoldiglucosid aus Eucommia ulmoides, einer in China bei Hypertonie verwendeten Droge (153), waren im PDE-Hemmtest aktiv und wirkten hypotensiv (154). Das Norlignan cis-Hinokiresinol, das aus Anemarrhena asphodeloides isoliert worden war, zeigte ebenfalls starke PDE-Hemmung (155).

Lignan	$IC_{50} (\times 10^{-5} \text{ M})$
Metairesinol	8,9
Arctigenin	13,9
cis-Hinokiresinol	9,7
Pinoresinol	7,5
Pinoresinol- β -D-glucosid	14,2
Pinoresinol-di- β -D-glucosid	8,9
Syringaresinol	17,5
Syringaresinol-di- β -D-glucosid	12,5
(Papaverin)	1,0)

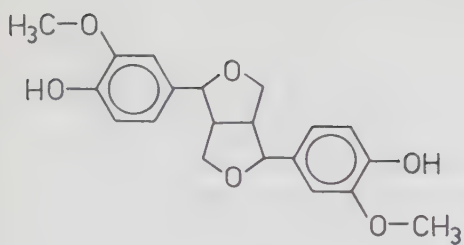
Tab. 18: PDE-Hemmung einiger Lignane (154,155)

IC_{50} ist die Substanzkonzentration, die für eine 50 %ige Hemmung der PDE-Aktivität (aus Rinderherz gewonnen) nötig ist.

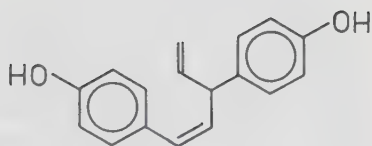
Da vermutet wurde, daß die Anwesenheit zweier p-Hydroxyphenylgruppen für die Hemmwirkung der Lignane notwendig ist, und da Phenylpropane die Monomeren der Lignane darstellen, sind einige synthetische **Phenole** auf ihre PDE-Wirkung hin untersucht worden (Tab. 19). Diese Verbindungen zeigten zwar Hemmung der PDE, aber wesentlich schwächer als Lignane, z. B. cis-Hinokiresinol.

Substanz	Hemmung % (50 μ g/ml)
cis-Hinokiresinol	61,2
p-n-Propylphenol	20,8
p-sec- Butylphenol	21,2
4,4'-Dihydroxydiphenol	28,0

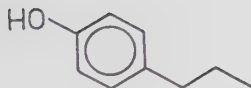
Tab. 19: PDE-Hemmung einiger Phenole (155)



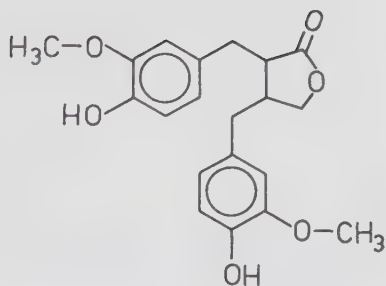
(I)



(II)



(III)



(IV)

Abb. 31: Strukturformeln von Pinoresinol (I), cis-Hinokiresinol (II), p-n-Propylphenol (III) und Metairesinol (IV)

III. Untersuchung der PDE-Hemmung von Viscum album-Extrakten und -Inhaltsstoffen

In einer ersten Testserie* erwiesen sich der Methanolgesamt-extrakt und die Butanolfraktion als mäßige Inhibitoren der Phosphodiesterase aus Hundeherz, wobei die Butanolfraktion, die die Phenylpropanverbindungen und Lignanglykoside in höherer Konzentration enthielt, eine etwas stärkere Hemmung zeigte. Gleichzeitig wurde auch eine geringe positiv inotrope Wirkung am isolierten Papillarmuskel des Meerschweinchens festgestellt.

In guter Übereinstimmung damit lagen die Ergebnisse in einem zweiten Testmodell** mit Phosphodiesterase aus menschlichen Thrombocyten (Tab. 20).

Konzentration	% Hemmung der PDE	
	MeOH-Extrakt	BuOH-Fraktion
1 mg/ml	86	95
0,1 mg/ml	50	70
0,01 mg/ml	7	17

Tab. 20: PDE-Hemmung des MeOH-Extraktes und der BuOH-Fraktion

* Wir danken Herrn Dr. Baumgarth, Fa. Merck, Darmstadt, für die freundliche Durchführung des Tests.

** Wir danken Herrn Prof. Dr. Anton und Dr. Beretz, Straßburg, für die freundliche Durchführung des Tests.

Auch hier wurde bei der Butanolfraktion eine etwas stärkere Hemmung gemessen. Da die untersuchten Extrakte aber neben den Phenylpropanverbindungen und Lignanen (Syringaresinolmono- und -diglucosid) noch Flavonoide enthielten und sich somit noch nichts über die eigene Hemmwirkung der Phenylpropanverbindungen aussagen ließ, wurden anschließend die isolierten Reinsubstanzen getestet. Im ersten Testmodell* (PDE aus Hundeherz) zeigten weder Syringin (Konzentration bis 5 µg/ml $\hat{=}$ 13,4 µM) noch Syringaresinoldiglucosid (Eleutherosid E, Konzentration bis 3,5 µg/ml) eine Hemmung.

Parallel dazu wurde das zweite Testmodell** (PDE aus menschlichen Thrombocyten) eingesetzt (Tab. 21). Hier wurde nur eine sehr geringe Hemmung gefunden. Das Syringaresinoldiglucosid hemmte die cAMP-PDE bei 67,3 µM ($\hat{=}$ 50 µg/ml) nur zu 6 %. Diese schwache Wirkung steht im Gegensatz zur Literaturangabe (154), nach der diese Verbindung bei 125 µM eine 50 %ige Hemmung besitzen sollte.

	% cAMP-PDE-Hemmung		
	50 µg/ml	5 µg/ml	0,5 µg/ml
Syringin, angereicherte Fraktion (etwa 95 % Gehalt)	19	0	0
Syringin, rein	2	0	0
Syringaresinoldiglucosid	6	0	0

Tab. 21: PDE-Hemmung der isolierten Reinsubstanzen

Damit bleibt ungeklärt, ob die gemessene Phosphodiesterase-Hemmung auf die Phenylpropanverbindungen oder weitere in der Butanolfraktion enthaltenen Substanzen zurückzuführen ist.

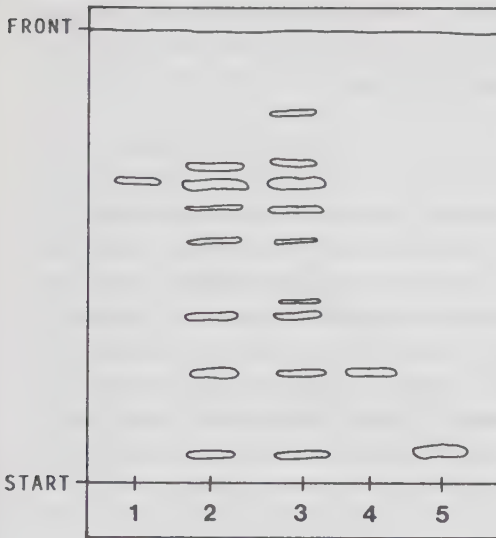
IV. Nachweis weiterer Verbindungen, die mit einer antihypertonischen Wirkung in Zusammenhang gebracht werden können

Als weitere Substanzen, die mit der antihypertonischen Wirkung in Verbindung gebracht werden können, sind zu nennen: Proteine (Viscotoxine), Cholin und Cholinester sowie biogene Amine.

1. Proteine, Aminosäuren

Die zur Testung auf PDE-Hemmung verwendeten Extrakte untersuchten wir mit Hilfe des Folin-Ciocalteus-Reagens nach der Methode von LOWRY (163) ("Proteinbestimmung"; s. Exp. Teil). Wir fanden einen theoretischen Proteingehalt von 0,46 % im Methanolextrakt und von 0,54 % in der Butanolfraktion. Da diese positive Reaktion sowohl von freien phenolischen Aminosäuren (Tyrosin u. a.) wie auch von anderen freien Phenolen (z. B. Sinapinalkohol) hervorgerufen werden kann, prüften wir zusätzlich mittels Disc-Elektrophorese (7,168) auf die Anwesenheit von Viscotoxinen. Nach Anfärben mit Amidochromschwarz B konnten wir weder im MeOH-Extrakt noch in der BuOH-Fraktion Zonen feststellen. Auch über HPLC nach der Methode von JORDAN (174) konnten wir keine Viscotoxine nachweisen.

Eine im Anschluß hieran durchgeführte Dünnschichtchromatographie auf Aminosäuren (s. Abb. 32) zeigte einen relativ hohen Gehalt an **Tyrosin** neben Prolin, Arginin und Alanin. Die Konzentration war in der Butanol-Fraktion genauso hoch wie im Methanolextrakt. Somit kann die phenolische Aminosäure Tyrosin für die positive Reaktion mit dem Folin-Ciocalteus-Reagens mit verantwortlich gemacht werden.



Zuordnung:

- 1: Tyrosin
- 2: Butanolfraktion
- 3: Methanolextrakt
- 4: Prolin
- 5: Arginin

Det.: Ninhydrin-Reagens
DC-D10

LM: DC-T14

Abb. 32: DC-Nachweis von Aminosäuren in den auf PDE-Hemmung getesteten *Viscum album*-Extrakten

2. Cholin und Cholinester

Über das Vorkommen von Cholin und Acetylcholin in *Viscum album* wurde bereits berichtet (24,59).

In allen Dünnschichtchromatogrammen (s. Abb. 33) von Drogenextrakten verschiedener Wirtsbäume (*Pinus*, *Malus*, *Quercus*, *Tilia* und *Ulmus*) sowie in Kneipp-Mistel-Pflanzensaft^R konnten wir nach Detektion mit Dragendorff/ NaNO_2 -Reagens Cholin als stark grau-violett gefärbte Zone bei $R_f = 0,1$ nachweisen.

Acetylcholin, das auf HPTLC-Platten einen etwas höheren Rf-Wert aufweist, konnte in keinem Fall nachgewiesen werden. Um auszuschließen, daß durch vorausgegangene Hydrolyseprozesse Acetylcholin dem Nachweis entgangen war, untersuchten wir mit flüssigem Stickstoff schockgefrorene Frischdroge. Auch hier war nur Cholin nachweisbar.

Das in allen pflanzlichen und tierischen Zellen vorkommende Cholin entsteht im Organismus in den Ganglien der Nervenzellen durch Hydrolyse aus Acetylcholin und ist 10 000 bis 100 000 mal weniger wirksam als dieses. Die Resorption im Magen-Darm-Trakt dürfte nach peroraler Aufnahme relativ klein und die orale Wirksamkeit nur gering sein. Die Konzentration von Cholin in der Droge ist mit Sicherheit nicht so groß, daß es an der blutdrucksenkenden Wirkung oral verwendeter Mistelextrakte maßgeblich beteiligt ist. Als "lipotroper Leberschutzstoff" wird es in einer Menge von 2 bis 4 g dosiert (124).



Zuordnung:

- 1: Cholin
- 2: Methanolextrakt von
Viscum album
- 3: Acetylcholin

Det.: Dragendorff / NaNO_2
DC-D8

LM: DC-T12

Abb. 33: DC-Nachweis von Cholin in Viscum album

3. Amine

Das Vorkommen von Tyramin, β -Phenylethylamin und Histamin in *Viscum album* wurde von KRZACZEK (24) beschrieben. GREVEL (166) konnte in methanolischen Extrakten zwar Tyramin und β -Phenylethylamin nachweisen, nicht aber Histamin, das SAJNER und VERIS (21) 1957 in der Droge gefunden hatten.

In Aminfraktionen, die über Extrelut^R-Ausschüttelung getrockneter Drogen verschiedener Herkunft hergestellt waren, konnten wir keine der genannten Amine nachweisen. Auch aus schockgefrorenem, frischem Drogenmaterial war nach schonender Aufbereitung (Vermeidung von starker Hitze wegen der Flüchtigkeit vieler Amine) weder nach Extrelut^R-Anreicherung noch nach herkömmlicher Säure-Base-Ausschüttelung ein positiver Nachweis zu erhalten (s. Exp. Teil).

Damit können auch die biogenen Amine für die Erklärung der Herz-Kreislaufwirkung nicht herangezogen werden.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Auf der Suche nach dem antihypertonen bzw. kardiotonen Wirkprinzip von Viscum album L. wurden durch Kombination verschiedener chromatographischer Verfahren (Säulenchromatographie, präp. Schichtchromatographie) aus der Butanolfraktion der Droge drei neue Verbindungen isoliert. Die Strukturaufklärung erfolgte hauptsächlich durch MS, NMR-Spektroskopie sowie durch Methylierungsanalyse. Durch Hydrolyseversuche konnte die Struktur einer vierten Verbindung geklärt werden.

Substanz A enthält laut MS-, ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektren als Aglykon Sinapinalkohol. Als Zuckerkomponenten konnten Glucose und die seltene, verzweigt-kettige Apiose identifiziert werden. Durch GC/MS-Analyse ermittelten wir eine 1 $\rightarrow$ 2-Verknüpfung der Glucose mit der endständigen Apiose und identifizierten das Biosid als Apiobiose. Substanz A ist somit Syringenin-4-O- β -D-apiofuranosyl-1 $\rightarrow$ 2- β -D-glucopyranosid.

Substanz B leitet sich ebenfalls vom Sinapinalkohol ab und liefert bei der Hydrolyse nur Glucose. Die Verbindung entstand auch bei der Partialhydrolyse aus Substanz A. Substanz B ist als Syringenin-4-O- β -D-glucopyranosid mit dem bereits früher nachgewiesenen Syringin identisch.

Substanz C konnte nach Vergleich der DC-, HPLC- und UV-Daten mit denen der aus *Acanthopanax* (*Eleutherococcus*) *senticosus* isolierten Substanz Eleutherosid E als das Lignan Syringaresinol-4',4''-O-di- β -D-glucopyranosid identifiziert werden. Es ist die Dimerverbindung von Substanz B.

Substanz D, die bei der Mikrohydrolyse aus Substanz C entstand, besitzt die Struktur eines Syringaresinol-4'-O- β -D-monoglucopyranosids.

2. Die Butanolfraktion zeigte in zwei unabhängigen Testen eine etwas stärkere Hemmung der cAMP-Phosphodiesterase als der methanolische Gesamtextrakt. Die isolierte Hauptverbindung Syringin war dagegen inaktiv. Es ist somit fraglich, ob die nachgewiesenen Phenylpropanverbindungen an der antihypertonen Wirkung von Mistelextrakten direkt beteiligt sind. Aufgrund der leichten Umwandelbarkeit der Phenylpropanverbindungen zu den pharmakologisch aktiveren Lignanen ist eine Wirkung über diesen Mechanismus denkbar.
3. Da die isolierten Phenylpropanverbindungen gut detektierbar und in allen untersuchten Mistelextrakten nachweisbar waren, eignen sie sich im Gegensatz zu den Flavonoiden zur HPLC-Fingerprintanalyse der Drogenextrakte. Verwendet wurde ein reversed-phase-System mit einer LiChrospher 100 CH18/2-Säule und ein Gradientensystem mit Acetonitril-Wasser-Gemischen.
4. Die quantitative Bestimmung der Phenylpropanderivate erfolgte mit Resorcin als Innerem Standard und durch Auswertung über die Peakflächen. Der Gehalt der beiden Hauptverbindungen Syringin und Syringeninapiosylglucosid lag jeweils zwischen 40 mg und 70 mg pro 100 g getrockneter Droge. Damit ist diese Bestimmung auch zur Standardisierung von Mistelextrakten geeignet.
5. Bei der quantitativen Bestimmung der frischen Preßsäfte und der durch eine Milchsäuregärung fermentierten Preßsäfte konnte festgestellt werden, daß nach Beendigung der Fermentation Syringin vollständig, Syringeninapiosylglucosid dagegen nur zu etwa einem Drittel abgebaut worden war. Die HPLC-Analyse kann somit zum Identitätsnachweis der Droge und zur Kontrolle des Fermentationsprozesses herangezogen werden.

6. Die HPLC-Methode ist auch zur Fingerprintanalyse bzw. zur Standardisierung von mistelhaltigen Kombinationspräparaten einsetzbar. Der Nachweis der charakteristischen Phenylpropan- bzw. Lignanverbindungen gelang in elf Fertigpräparaten, wobei der Mistelanteil z. T. unter 20 % der bis zu 16 verschiedenen zugesetzten Drogen betrug. Nach Ausarbeitung einer geeigneten Probenaufbereitung wurde in einem Kombinationspräparat die quantitative HPLC-Bestimmung der Phenylpropanverbindungen durchgeführt.
7. Die HPLC-Analyse der Mistel-Flavonoide ließ das Vorliegen verschieden stark methylierter Flavonolglykoside und -aglyka erkennen. Das Flavonoidspektrum zeigte jedoch bei Misteln verschiedener Herkunft Unterschiede, so daß es für einen Identitätsnachweis der Droge nur bedingt herangezogen werden kann.

EXPERIMENTELLER TEIL

I. Herkunft des Drogenmaterials, der Vergleichssubstanzen und Chemikalien

Drogen:

- Hb. Visci albi conc., getrocknet
Fa. ICI-Pharma*, Plankstadt, L.J. 34582
keine Angabe des Wirtes
- Viscum album, getrocknete Ganzdroge
Fa. Birkenweg*, Kleinostheim, Art. 103071, Muster 577/5
keine Angabe des Wirtes
- Viscum album, Wirt: Ulmus glabra
eigene Ernte aus dem Nymphenburger Park
in München im April 1983
- Viscum album, Wirt: Tilia cordata
eigene Ernte aus dem Nymphenburger Park
in München im Oktober 1985
- Viscum album, Wirt: Pinus
Viscum album, Wirt: Malus
Viscum album, Wirt: Quercus
jeweils Frischdroge, Preßsaft und Gärssaft
Verein für Krebsforschung*, Arlesheim

* Wir danken den Firmen für die freundliche Überlassung des Drogenmaterials.

- Viscum album, var. coloratum
Korea Research Institute of Chemical Technology, Chung Nam.,
keine Angabe des Wirtes
- Crataegi fructus
Fa. ICI-Pharma*, Plankstadt
- Extraktum Rauwolfiae
Fa. ICI-Pharma*, Plankstadt, L.J. 50240

Testsubstanzen:

Eleutherosid E und Syringaresinol stammen aus der Testsubstanzen-
sammlung des Institutes.

Quercetin, Reserpin, Rescinnamin und Ajmalin:
Fa. Roth, Karlsruhe

Reagentien:

Pyridin p.A., Fa. Merck, Art. 9728
Essigsäureanhydrid p.A., Fa. Merck, Art. 42
N-Methylimidazol, Fa. Merck, Art. 805852

II. Chromatographische Arbeitsmethoden

1. Dünnschichtchromatographie

1.1. Adsorbentien

Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten 20 x 20 cm,
Schichtdicke 0,25 mm, Fa. Merck

Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten für die Nano-DC (HPTLC)
10 x 10 cm, Fa. Merck

1.2. Laufmittelsysteme

Phenylpropanverbindungen:

<u>DC-T1:</u>	CHCl ₃ - MeOH - H ₂ O	70 : 30 : 4
<u>DC-T2:</u>	CH ₂ Cl ₂ - MeOH - H ₂ O	70 : 30 : 4
<u>DC-T3:</u>	CH ₂ Cl ₂ - MeOH - H ₂ O	80 : 25 : 4
<u>DC-T4:</u>	EtOAc - MeOH - H ₂ O	25 : 5 : 3,2
<u>DC-T5:</u>	EtOAc - MeOH - H ₂ O	25 : 10 : 4

LM	Rf von Substanz	
	A	B
DC-T1	0,3	0,5
DC-T2	0,45	0,65
DC-T3	0,26	0,47
DC-T4	0,25	0,35
DC-T5	0,46	0,54

Tab. 22: Rf-Werte der Substanzen A und B in verschiedenen
Laufmittelsystemen

Phenylpropanverbindungen, peracetyliert

DC-T6: CH₂Cl₂ - Aceton 82:18

Zucker:

DC-T7: CH₂Cl₂ - MeOH - HOAc - H₂O 16:10: 2: 2

Lignan-Aglyka (Syringaresinol):

DC-T8: Tol - EtOAc - Aceton 50:20:20

Flavonoide:

DC-T9: EtOAc - HCOOH - HOAc - H₂O 100:11:11:26
(Glykoside) (57,127)

DC-T10: Toluol - Ethylformiat - HCOOH 50:40:10
(Aglyka) (57,127)

Rauwolfia-Alkaloide:

DC-T11: Toluol - EtOAc - Diethylamin 70:20:10 (57,127)

Cholin / Acetylcholin:

DC-T12: EtOAc - H₂O - HOAc - HCl (25%ig) 60:24:27: 1

Amine: (Histamin, β -Phenethylamin, Tyramin)

DC-T13: Ether - MeOH - NH₃ (25%ig) 17: 2: 1

Aminosäuren:

DC-T14: Aceton - n-Butanol - HOAc- H₂O 35:35:10:20

1.3. Detektionsmittel

Phenylpropanverbindungen und Lignane:

DC-D1: Chlorsulfonsäurereagens: 1 Teil Chlorsulfonsäure mit 2 Teilen Eisessig mischen (Eiskühlung); nach Besprühen Erwärmen mit Fön, Auswertung im UV 365 nm und vis (72).

DC-D2: Antimon-III-chlorid-Reagens (SbCl_3):
20 %ige Lösung von SbCl_3 in Chloroform

DC-D3: konz. Schwefelsäure

Zucker:

DC-D4: 2 g Diphenylamin, 2 g Anilin und 10 ml Phosphorsäure 85 %ig werden gemischt und mit Methanol auf 100 ml aufgefüllt (Phosphorsäure zuerst in einem Teil Methanol lösen). Nach Besprühen 10 min auf 100 °C erhitzen; Auswertung im UV 365 nm und vis (76,77).

Flavonoide und Pflanzensäuren:

DC-D5: Naturstoffreagens nach NEU (1 %ig in MeOH), mit PEG 400-Lsg. (5 %ig in EtOH) nachbesprühen.

DC-D6: FeCl_3 (5 %ig in EtOH)

Phenole:

DC-D7: Echtblausalz-Reagens (0,5 %ig in H_2O)

Alkaloide und Amine:

DC-D8: Dragendorff-Reagens nach MUNIER und MACHEBOEUFF (170): 0,85 g basisches Wismutnitrat werden in 10 ml Eisessig und 40 ml Wasser gelöst und zu gleichen Teilen mit einer Lösung von 8 g Kaliumiodid in 20 ml Wasser gemischt. 10 ml dieser Vorratslösung, gemischt mit 20 ml Eisessig und 100 ml Wasser, dienen als Sprühlösung. Durch Nachbesprühen mit 10 %iger wäßriger NaNO_2 -Lösung läßt sich die Nachweisempfindlichkeit erhöhen.

DC-D9: 0,02 %ige Lösung von Fluorescamin (Fa. Serva) in Aceton. Primäre Amine fluoreszieren hellblau, sekundäre Amine dunkelblau im UV 365 nm (175).

DC-D10: Ninhydrin-Reagens (57)

2. Säulenchromatographie

Adsorbens: Kieselgel 60, Korngröße < 230 mesh,
Fa. Merck

Eluens: DC-T1

Glassäule: 40 cm x 4,7 cm mit Fritte

Auftragemenge: 2,5 bis 3 g der Butanolfraktion

Durchführung:

300 g Kieselgel wurden mit dem Elutionsmittel zu einem Brei aufgeschlämmt und zur Entfernung von Luftblasen 20 min unter leichtem Vakuum gerührt. Nach dem blasenfreien Eingießen der Masse in die Glassäule wurde einige Stunden mit dem Elutionsmittel gewaschen, dann mit einem Rundfilter und mit Seesand bedeckt. Das Substanzgemisch wurde in möglichst konzentrierter Lösung im Eluens mit einer Pasteurpipette aufgetragen. Zur Erhöhung des Drucks wurde eine zweite Säule aufgesetzt und ebenfalls mit Eluens gefüllt. Die im Fraktionsschneider gesammelten Fraktionen (alle 30 min $\approx$ 10 ml) wurden dünn-schichtchromatographisch überprüft.

3. Präparative Schichtchromatographie

Adsorbens: Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten
20 x 20 cm, Schichtdicke 0,5 mm, Fa. Merck

Vorbehandlung: Zweimalige Leerentwicklung in MeOH 80 %ig

Laufmittelsystem: DC-T1

Detektion: Die Zonen wurden unter UV 254 nm markiert und mit einer Rasierklinge der Platte entnommen.

Elution: 3 x mit Mischung aus CH_2Cl_2 - MeOH (1:1). Kontrolle der Vollständigkeit mit reinem MeOH

Aufarbeitung: Zentrifugation (5 min bei 4000 U/min), Filtration durch eine Glasfritte (D4)

4. Gaschromatographie

a) Gerät: Perkin Elmer 900
Trärgas: Argon, 30 ml/min
Detektor: FID
Temperatur: Detektor und Einspritzblock 250 °C
Schreiber: Perkin Elmer 56
Papiervorschub: 0,5 cm/min
Säule: Glas, 300 cm x 2 mm
3 % OV-225 auf Chromosorb W-HP
(80 - 100 mesh)
Temperaturprogramm: 170 °C isotherm

b) Gerät: Perkin Elmer Sigma 1 B
Trärgas: Argon
Detektor: FID
Temperatur: Detektor und Einspritzblock 250 °C
Säule: Chrompack 14024 Kapillarsäule
OV-225 FS, 25 m x 0,23 mm
Temperaturprogramm: 150 °C bis 210 °C, Aufheizrate 5 °C/min

5. Hochleistungsflüssigchromatographie

5.1. Apparative Daten

a) Liquid Chromatograph HP 1090 mit HP 1040A Photodiodenarray-Detektor, kombiniert mit HP 85B Tischcomputer, HP 9121 Diskettenlaufwerk und HP 7470A Plotter (Hewlett Packard, Waldbronn)

b) Pumpen: M 6000 A (Waters GmbH, Eschborn)
Gradientenprogrammer: M 660 (Waters GmbH)
Einspritzteil: WISP 710 B (Waters GmbH)
Detektor: LC 75 (Perkin Elmer)
Datensystem: M 730 (Waters GmbH)

c) Pumpen: Perkin Elmer Serie 3B
Einspritzteil: U 6 K (Waters GmbH)
Detektor: Schoeffel SF 770 Spektralphotometer

5.2. Lösungsmittel

Als Laufmittel für die HPLC wurden ausschließlich Lösungsmittel in ChromAR-Qualität (Fa. Promochem, Wesel) verwendet. Das Wasser war destilliert.

5.3. Trennsysteme

TS-1: für Phenylpropan-Fingerprint

Säule: Hibar LiChrospher 100 CH-18/2 (5 µm)
Stahlsäule 125 x 4 mm ID, Merck Art. 50477
Fließmittel: A: Acetonitril - Wasser 8:92
B: Acetonitril - Wasser 42:58

Gradient: von 0 % B nach 50 % B in 35 min;
linearer Anstieg; anschl. 5 min Spülen mit
100 % B
Flow: 1,0 ml/min
Det.: 220 nm

TS-2: für quantitative Bestimmung der Phenylpropane

Säule: Hibar LiChrospher 100 CH-18/2 (5 µm)
Fließmittel: A: Acetonitril - Wasser 8:92
B: Acetonitril - Wasser 42:58
Gradient: von 0 % B nach 50 % B in 40 min;
linearer Anstieg; anschl. 5 min Spülen mit
100 % B
Flow: 1,0 ml/min
Det.: 220 nm, 4 nm Bandbreite

TS-3: für Phenylpropanverbindungen

Säule: µ-Bondapak C18 (10 µm)
Stahlsäule 300 x 4 mm ID (Waters GmbH)
Fließmittel: A: Acetonitril - Wasser 9:91
B: Acetonitril - Wasser 25:75
Gradient: von 0 % B nach 100 % B in 35 min;
linearer Anstieg
Flow: 2,0 ml/min
Det.: 220 nm

TS-4: für die quantitative Serienanalyse (HP 1090)

Säule: Hibar LiChrospher 100 CH-18/2 (5 µm)
Fließmittel: A: Wasser
B: Acetonitril

Gradient: von 8 % B nach 16,5 % B (in A) in 20 min;
linearer Anstieg; anschl. 5 min Spülen mit
60 % B
Flow: 1,0 ml/min
Det.: 220 nm, 4 nm Bandbreite

TS-5: für Flavonoide und Phenolcarbonsäuren

Säule: Hibar LiChrospher 100 CH-18/2 (5 µm)
Fließmittel: A: Acetonitril - Wasser - HOAc 14:86: 2
B: Acetonitril - Wasser - HOAc 30:70: 2
Gradient: von 0 % B nach 100 % B in 20 min;
linearer Anstieg; 100 % B von 20 bis 30 min
isokratisch
Flow: 0,7 ml/min
Det.: 340 nm

TS-6: für Phenylpropan-Verbindungen

Säule: Hibar LiChrospher 100 CH-18/2 (5 µm)
Fließmittel: A: Acetonitril - Wasser 8:92
B: Acetonitril - Wasser 25:75
Jeweils Zusatz von 10 ml 0,1N H_3PO_4 /l
Gradient: von 0 % B nach 100 % B in 40 min;
linearer Anstieg
Vorsäule: RP-18, Kartusche und Halterung Fa. Merck
Flow: 1,0 ml/min
Det.: 220 nm

Der Zusatz von Phosphorsäure bewirkt zwar eine Abnahme der Peakbreite, aber aufgrund der durch die Phosphorsäure bedingten Überlagerungen von Signalen in diesem System wurde meist TS-2 bevorzugt.

TS-7: für Rauwolfia-Alkaloide

Säule: Hibar LiChrospher 100 CH-18/2 (5 µm)
Fließmittel: Acetonitril - Wasser 54:46
Zusatz von Pic B7-Reagens (Waters GmbH)
Flow: 1,0 ml/min
Det.: 240 nm

5.4. Zubereitung der Probelösungen

Es wurden nur partikelfreie Lösungen injiziert, evtl. mußte vor der Analyse filtriert werden (0,45 µ).

5.4.1. Butanolfraktion der Droge Viscum album

1,0 g gepulverte Droge wurde mit 50 ml Ethanol 90 % versetzt und 30 Minuten unter Rückfluß extrahiert. Das Filtrat wurde auf etwa 1 ml eingengt und mit demineralisiertem Wasser auf 4 ml verdünnt.

Zur Entfernung der lipophilen Bestandteile schüttelten wir mit Dichlormethan p.A. bis zur Farblosigkeit der Unterphase aus (ca. 3 - 4 mal). Anschließend wurde dreimal mit je 4 ml wassergesättigtem n-Butanol p.A. ausgeschüttelt. Das geschah durch Schütteln in 10 ml-Zentrifugengläsern mit anschließendem Zentrifugieren (Emulsionsbildung) und Abheben der Butanol-Phase mit Pasteurpipetten.

Nach Trocknen der vereinigten n-Butanol-Fractionen über wasserfreiem Natriumsulfat (Fa. Merck) wurde filtriert und zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde mit 3 ml 80 %igem Acetonitril ChromAR aufgenommen und von der klaren Lösung 3 bis 10 µl direkt zur HPLC eingespritzt.

5.4.2. Butanolfraktion der Fertigpräparate

5,0 ml einer Flüssigspezialität wurden zur Entfernung des Alkohols am Rotationsverdampfer auf etwa 1 ml eingeengt und mit demineralisiertem Wasser auf 4 ml verdünnt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte entsprechend der Vorschrift für die Droge durch Ausschütteln mit Dichlormethan p.A. und n-Butanol p.A., Trocknen der vereinigten Butanolfraktionen mit Natriumsulfat, Einrotieren und Lösen des Rückstandes in 3 ml 80 %igem Acetonitril ChromAR.

3 bis 10 µl der klaren Lösung wurden zur HPLC eingespritzt.

Dragees: 10 bis 15 Dragees wurden pulverisiert und mit 20 ml Methanol am Rückfluß 20 min extrahiert. Nach dem Filtrieren wurde eingeengt, in 4 ml Wasser aufgenommen und weiter wie oben aufbereitet.

Schererkapseln: 10 Kapseln (Salus^R) bzw. 20 Kapseln (Jumistan^R) wurden ausgepreßt und in 4 ml Wasser aufgenommen. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie bei den Flüssigspezialitäten.

5.4.3. Probenbereitung aus der Droge für die quantitative Bestimmung

Etwa 700 mg fein gepulverte Droge (genau gewogen) wurden mit 50 ml Methanol p.A. und 0,6 ml Resorcin-Standardlösung E* (entsprechend etwa 0,65 mg Resorcin) versetzt und 20 min am Rückfluß auf dem Wasserbad extrahiert. Mit 10 ml Methanol wurde nachextrahiert und die vereinigten Filtrate bis fast

* Resorcin-Standardlösung E:

27 mg Resorcin (genau gewogen) wurden mit Methanol auf 25,00 ml aufgefüllt

zur Trockne (ca. 1 ml) einrotiert. Auf etwa 3 ml wurde mit Methanol aufgefüllt und mit der halben Menge Wasser verdünnt, worauf ein Niederschlag ausfiel. Die trübe Lösung filtrierten wir durch eine mit Watte am Einlaß versehene SepPak C-18 Kartusche (Fa. Waters GmbH) und füllten mit 50 %igem Acetonitril durch diese Kartusche auf 10,00 ml auf.

Zur HPLC wurden 5 µl dieser klaren Lösung eingespritzt.

5.4.4. Probenbereitung aus Tinct. Visci albi für die quantitative Bestimmung

(Ausgangsextrakt für die Herstellung von Asgoviscum^R)

0,75 ml der Tinktur wurden mit 0,6 ml Resorcin-Standardlösung E (1:10-Verdünnung, entsprechend etwa 65,6 µg Resorcin) mit 5 ml einer Mischung aus CH₂Cl₂ - MeOH (1:1) versetzt, worauf ein Niederschlag ausfiel. Die trübe Lösung filtrierten wir durch eine mit Watte am Einlaß versehene SepPak Si Kartusche. Mit 5 ml obiger Mischung wurde nachgespült, das Filtrat eingengt und mit ca. 1 ml 50 %igem MeOH gelöst. Diese Lösung wurde durch eine SepPak C-18 Kartusche filtriert und mit 5 ml 50 %igem MeOH nachgespült. Das Filtrat wurde eingengt und mit 50 %igem Acetonitril auf 1,00 ml gelöst.

In die HPLC wurden 5 µl dieser klaren Lösung eingespritzt.

5.4.5. Probenbereitung aus Asgoviscum^R und Asgoviscum forte^R liquid. für die quantitative Bestimmung

1 ml der flüssigen Spezialität wurden mit 0,6 ml Resorcin-Standardlösung E (1:10-Verdünnung, entsprechend etwa 65,6 µg Resorcin) und mit 5 ml einer Mischung aus CH₂Cl₂ - MeOH (1:1) versetzt, worauf ein Niederschlag ausfiel. Die trübe Lösung filtrierten wir durch eine mit Watte am Einlaß versehene SepPak Si Kartusche. Mit 5 ml obiger Mischung wurde nachgespült

und das Filtrat eingeeengt. Dann wurde in ca. 1 ml 50 %igem MeOH gelöst. Diese Lösung wurde durch eine SepPak C-18 Kartusche filtriert und mit 5 ml 50 %igem MeOH nachgespült. Das Filtrat wurde eingeeengt und mit 50 %igem Acetonitril auf 1,00 ml gelöst.

In die HPLC wurden 5 µl dieser klaren Lösung eingespritzt.

5.4.6. Probenbereitung aus den Preßsäften für die quantitative Bestimmung

Etwa 0,6 mg Frischsaft wurden 40 min bei 4000 U/min zentrifugiert, vom Überstand 160 mg in ein 1 ml Meßkölbchen eingewogen, mit 0,6 ml Resorcin-Standardlösung E (1:10-Verdünnung in 20 %igem Methanol, entsprechend etwa 65,6 µg Resorcin) versetzt und mit Methanol aufgefüllt. Die Lösung wurde sodann wieder zentrifugiert oder filtriert.

Vom klaren Überstand wurden 5 µl zur HPLC eingespritzt.

5.4.7. Probenbereitung aus den Gärssäften für die quantitative Bestimmung

Etwa 190 mg Gärssaft wurden in ein 1 ml Meßkölbchen eingewogen, mit 0,6 ml Resorcin-Standardlösung E (1:10-Verdünnung in 20 %igem Methanol, entsprechend etwa 65,6 µg Resorcin) versetzt und mit 40 %igem Methanol auf 1,00 ml aufgefüllt.

Von der klaren Lösung wurden 5 µl zur HPLC eingespritzt.

5.4.8. Probenbereitung für die Analyse der Flavonoide

Für die Untersuchung der Flavonoide wurden die Probelösungen von 5.4.1. - 5.4.7. verwendet.

5.4.9. Probenbereitung für die HPLC der Rauwolfia-Alkaloide

a) aus Rauwolfia Trockenextrakt (Fa. ICI-Pharma)

1 g Extrakt wurde nach Alkalisieren mit 10 %iger Ammoniaklösung mit 5 ml Methanol versetzt und ca. 5 min bei 60 °C extrahiert. 1 ml des filtrierten Extraktes wurde einrotiert, in 1 ml Wasser wieder aufgenommen und auf eine SepPak C-18 Kartusche aufgebracht. Mit 2 ml Wasser wurde durchgespült und die Alkaloide nach Elution mit 2,5 ml 90 %igem Acetonitril wiedergewonnen.

Zur HPLC wurden 10 µl des Eluates eingespritzt.

b) aus Asgoviscum forte^R liquid.

10 ml der Spezialität wurden auf etwa 1,5 ml eingeeengt, mit 3 Tr. 10 %igem Ammoniak versetzt und auf eine SepPak C-18 Kartusche aufgebracht. Mit 4 ml Wasser wurde durchgespült und die Alkaloide nach Elution mit 5 ml 90 %igem Acetonitril wiedergewonnen.

Zur HPLC wurden 10 µl des Eluates eingespritzt.

5. 5. Quantitative Bestimmung der Phenylpropanderivate

5.5.1. Herstellung der Eichlösungen, Responsefaktoren

27,36 mg Resorcin wurden in Methanol gelöst und auf 25,00 ml aufgefüllt ("Standardlösung E"), 1,04 mg Syringin ergaben zu 10,00 ml gelöst die Eichlösung.

Zur Errechnung der abs. Responsefaktoren (RF = eingespritzte Menge : Fläche) wurden je 5 µl der Eichlösung bzw. der Standardlösung E (1:10-Verdünnung) eingespritzt. Die Eichläufe wurden zur Mittelwertbildung fünfmal wiederholt. Mit einer neu eingewogenen Syringin-Eichlösung erhielten wir fast gleiche Werte.

Zur Linearitätsprüfung wurden verschiedene Mengen einer Mischung* aus Eich- und Standardlösung eingespritzt und die Peakflächen in Abhängigkeit von den eingesetzten Substanzmengen ausgewertet (Eichgerade siehe Abb. 17). In Tab. 23 sind die Einzelwerte aufgelistet.

Mit Hilfe der Molekulargewichte errechneten wir den Responsefaktor für Syringeninapiosylglucosid.

	µg	Fläche
Syringin	0,126	1,6256
	0,209	2,6970
	0,293	3,7495
	0,419	5,3927
Resorcin	0,108	0,8237
	0,162	1,2384
	0,270	2,0052
	0,377	2,7845
	0,539	4,0018
	0,809	6,0186
Der Korrelationskoeffizient betrug jeweils 0,999.		

Tab. 23: Peakflächen in Abhängigkeit von der Substanzmenge

* Mischung: 3,00 ml Syringin-Eichlösung + 0,30 ml Resorcin-Standardlösung E, auf 5,00 ml mit Methanol aufgefüllt.

5.5.2. Berechnung

Von den Analysenlösungen wurden jeweils 5 µl eingespritzt. Die Chromatogramme wurden elektronisch mit einem HP 3392A-Integrator (Hewlett Packard) ausgewertet. Nach der Methode des Inneren Standards (IS) wurde der Gehalt nach folgender Formel errechnet (s. auch S. 49):

$$\text{Gehalt (S) [mg/100 g]} = \frac{\text{Ar (S)} \times \text{RF (S)}}{\text{Ar (IS)} \times \text{RF (IS)}} \times \frac{\text{Menge IS [mg]} \times 100}{\text{Einwaage Droge [mg]}} \times 10^3 .$$

III. Isolierungen und Anreicherungen

1. Substanzen A bis D

600 g gepulverte Droge (Fa. ICI-Pharma) wurden zur Entfernung lipophiler Bestandteile mit 3,5 l Petrolether 24 Std. am Soxhlet extrahiert. Anschließend wurde zwei Tage mit 3 l Methanol extrahiert und der Auszug am Rotavapor zur Trockne eingengt.

20 g des zähflüssigen, grünen Rückstandes wurden in 50 ml Wasser suspendiert und nacheinander mit je 200 ml CH_2Cl_2 , EtOAc und n-BuOH (wassergesättigt) portionsweise ausgeschüttelt.

Die Butanolfraktion wurde über Na_2SO_4 getrocknet und in wenig Lösungsmittel gelöst (mobile Phase) zur Säulenchromatographie aufgetragen (siehe II.2.).

Etwa 150 Einzelfractionen wurden nach dünnschichtchromatographischer Überprüfung zu fünf Fractionen vereinigt:

K1	165 mg	
K2	200 mg	enthält Substanz B
K3	375 mg	
K4	70 mg	enthält Substanz A
K5	75 mg	

Aus den Fractionen K2 und K4 konnten wir über präparative DC (siehe II.3.) Substanzen A und B in kleinen Mengen (5 bzw. 20 mg) rein isolieren.

Saubere PA-Substanz A erhielten wir auch nach Acetylierung der angereicherten Fraction K4 (Schnellmethode mit NMID) und anschließender Auftrennung der Acetate über eine kleine Säule (ca. 30 x 0,6 cm, LM: CH_2Cl_2 -Aceton 9:1).

Substanzen C und D gewannen wir direkt durch präparative Schichtchromatographie für die Hydrolyseversuche und DC/HPLC-Untersuchungen.

2. Extraktion für die Untersuchung der Aminosäuren

1 g gepulverte Droge wurde mit 20 ml Methanol (50 %ig) 20 min am Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde filtriert und auf die Hälfte einrotiert. Zur DC wurden etwa 30 μl aufgetragen. Die auf PDE-Hemmung getesteten MeOH- und BuOH-Fractionen wurden direkt aufgetragen.

3. Extraktbereitung für die Untersuchung der Amine (166)

Aufgrund der Flüchtigkeit vieler kardiotoner Amine verwendeten wir frisches Pflanzenmaterial (2 bis 3 g). Mit flüssigem Stickstoff wurde schockgefroren, gemahlen und 24 Std. mit Methanol kalt am Magnetrührer extrahiert. Wir rotierten die Extrakte vorsichtig bis zur dickflüssigen Konsistenz ein.

a) Extrelut^R-Anreicherung

Der Rohextrakt wurde in 0,1 %iger HCl suspendiert und auf eine mit Filterpapier bedeckte Extrelut^R-Säule (6 ml, selbst gefüllt) aufgebracht. Das Filterpapier mit dem ungelösten Anteil wurde abgehoben und die sauren und lipophilen neutralen Verbindungen mit 2 x 6 ml Diethylether aus der Säule gewaschen. Anschließend alkalisierten wir, indem wir Ammoniakgas durch die Säule saugten. Die basischen Verbindungen konnten nun mit einem Gemisch von CH_2Cl_2 -Isopropanol (9:1) von der Säule gewaschen werden.

b) Säure-Base-Ausschüttelung

Der Rohextrakt wurde mit 5 ml Wasser versetzt und das Chlorophyll abzentrifugiert. Nach Ansäuern mit HCl (10 %ig) schüttelten wir zweimal mit Diethylether aus. Mit NH_3 (25 %ig) alkalisierten wir und gewannen die Aminfraktion durch Ausschütteln mit CH_2Cl_2 . Nach Einrotieren blieb ein gelber Rückstand.

IV. Spektroskopische und physikalische Methoden

1. ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Geräte: Bruker WP-80 (20,15 MHz)
Bruker AM-300 (75,47 MHz)*

2. ^1H -NMR-Spektroskopie

Gerät: Bruker WP-80 (80 MHz)
Lösungsmittel: CDCl_3 bzw. DMSO-d_6
mit TMS als Internen Standard

3. Massenspektren

Gerät: Massenspektrometer MS 30 der Fa. AEI

4. GC-MS

Gerät: Kratos MS 80 RFA
200 °C Ionenquelle, 70 eV, 4 kV, 1 s/dec.
Trägergas: Argon 0,8 ml/min
Säule: Chrompack 14024 Kapillarsäule
OV 225 FS, 25 m x 0,23 mm
Temperaturprogramm: 150 °C bis 210 °C, Aufheizrate 5 °C/min

* Wir danken der Fa. Bruker, Karlsruhe, für die freundliche Aufnahme der Spektren.

5. UV-Spektren

Geräte: DB-GT UV-Spektrometer, Fa. Beckmann
550 SE UV/VIS Spektrophotometer, Fa. Perkin Elmer
Die Spektren wurden in methanolischer Lösung aufgenommen.
HP 1040A Photodiodenarray, s. HPLC (II.5.)

6. Schmelzpunkte

Gerät: Kofler-Heizbank, Fa. Reichert, Wien
Die Werte sind unkorrigiert.

V. Chemische Arbeitsmethoden

1. Hydrolysen

1.1. Trifluoressigsäure-Hydrolyse

Etwa 1 mg Substanz wurde in 1,5 ml 2N-TFA bzw. 0,5N-TFA gelöst und 2 Std. im geschlossenen Spitzkolben auf dem Dampfbad erhitzt. Danach wurde unter wiederholter Zugabe von Methanol zur Entfernung der TFA eingeeengt, der Rückstand in Wasser - Methanol (2:1) aufgenommen und zur DC aufgetragen.

In den Substanzen A bis D konnte mit dieser Methode jeweils Glucose nachgewiesen werden, Apiose war in keinem Fall identifizierbar.

1.2. Hydrolyse mit Schwefelsäure und Essigsäure

Ca. 1 - 2 mg Substanz wurden im Spitzkolben mit 5 ml 5 %iger Schwefelsäure (mit 50 % EtOH verdünnt) bzw. 5 %iger Essigsäure gelöst und unter Rückfluß 2 1/2 Stunden am Dampfbad gehalten. Dem Kolben mit der Schwefelsäure fügten wir nach dem Abrotieren des Ethanolis solange festes BaCO_3 zu, bis ein neutraler pH-Wert erreicht war. Das auf 1 ml einrotierte Filtrat wurde zur DC aufgetragen. Der Kolben mit der Essigsäure konnte direkt einrotiert und in 1 ml gelöst aufgetragen werden.

Neben Glucose war in Substanz A, Fangulin B und Apiin die Apiose als gelbe Zone nachweisbar. Sie erschien im Hydrolysat mit 5 %iger Essigsäure deutlicher und aufgrund geringerer Zersetzung in höherer Konzentration.

1.3. Partialhydrolyse im Mikromaßstab

30 µl wäßrige Lösung oder Suspension der Substanz wurden in einem "Mikro-Konus", wie sie in Probengebern der HPLC zum Einspritzen kleinster Mengen verwendet werden, gelöst und mit der gleichen Menge Essigsäure versetzt. Das verschlossene Gefäß wurde bei 70 °C in den Trockenschrank gestellt. Nach 1, 2 und 3 1/2 Std. wurde zur DC aufgetragen bzw. zur HPLC eingespritzt.

Auf diese Weise konnte die Abspaltung von 1 Mol Glucose bei Eleutherosid E beobachtet werden.

1.4. Mikrohydrolyse auf der DC-Platte

Auf DC-Fertigplatten mit Kieselgelbeschichtung wurden die Substanzen aufgetragen und der Bereich oberhalb der Auftragezone mit einer Glasplatte sorgfältig abgedeckt. Die Platten wurden in eine mit konz. Salzsäure 1 cm hoch gefüllte Glaskammer ge-

stellt, deren Boden innen so erhöht war, daß die Platten nicht mit der Salzsäure in Berührung kamen. Nach unterschiedlich langen Einwirkzeiten der Salzsäure bei Raumtemperatur bzw. im Trockenschrank bei ca. 50 °C wurden die Platten herausgenommen, gründlich unter dem Abzug abgefönt und anschließend entwickelt.

Apiose war unter diesen Bedingungen nicht mehr nachweisbar.

2. Derivatisierungen

2.1. Acetylierung

2.1.1. Standardmethode

15 mg Substanz wurden im Schliffkolben mit 0,5 ml Pyridin p.A. und 1 ml Acetanhydrid p.A. versetzt und 48 Std. bei Raumtemperatur stehengelassen. Durch eine Probe-DC (LM DC-T6) des Reaktionsgemisches ließ sich die Vollständigkeit der Umsetzung überprüfen. Bei einer unvollständigen Umsetzung (mehrere Zonen auf der DC) mußte die Reaktion bis auf 72 Std. verlängert werden.

Nach Zugabe eisgekühlten Wassers wurde der Ansatz über Nacht im Kühlschrank zur vollständigen Fällung stehengelassen, der Niederschlag abgesaugt, mit Eiswasser gewaschen und getrocknet.

2.1.2. Schnellmethode mit NMID (169)

10 mg Substanz wurden mit 0,2 ml N-Methylimidazol und 2 ml Acetanhydrid versetzt und 30 min stehengelassen. Nach Zusatz von 5 ml Wasser schüttelten wir mit CH_2Cl_2 dreimal aus.

2.2. Darstellung der partiell methylierten Alditolacetate

2 mg Substanz A und 4 mg Apiin wurden nach Trocknen (Trockenpistole, 22 Std., 40 °C) in einem Injektionsfläschchen in 2 ml DMSO (getr.) gelöst, nach Entfernen der Restluft mit N₂ verschlossen und kurz ins Ultraschallbad gestellt. Daraufhin tropften wir 1,5 ml Dimsyl-Na (Natrium-methylsulfinylmethanid) über eine Injektionsnadel zu. Der Ansatz wurde 30 min im Ultraschallbad und 16 Std. bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Reaktion mit Triphenylmethanfarbstoff ergab hiernach eine tiefe Rotfärbung. Unter Eiskühlung gaben wir 1,6 ml Methyljodid zu und stellten wieder 1 Std. auf das Ultraschallbad. Die klare, gelbe Lösung wurde durch Rotieren im Vakuum bei 20 °C vom überschüssigen Methyljodid befreit.

Nach Zugabe von 3 ml Wasser wurde 3 mal mit CH₂Cl₂ ausgeschüttelt und die vereinigten organischen Phasen mit Wasser gegengeschüttelt. Nach Einengen der org. Phase gaben wir 4 ml 0,5M TFA zu und erhitzen 16 Std. auf dem Dampfbad. Das Reaktionsgemisch wurde unter wiederholtem Zusatz von Wasser vorsichtig eingeeengt, bis die wäßrige Lösung neutral reagierte, dann mit einer Spatelspitze NaBD₄ versetzt (bis zur alkalischen Reaktion) und 2 Std. bei Raumtemperatur belassen. Zur Zerstörung des überschüssigen Reduktionsmittels wurde 2 ml Essigsäure p.A. zugegeben und im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wurde mehrmals in etwas Methanol und Essigsäure aufgenommen und abermals zur Trockne einrotiert.

Nach Zugabe von 0,5 ml Pyridin und 0,5 ml Acetanhydrid acetylierten wir 1 Std. am Dampfbad. Überschüssiges Acetanhydrid entfernten wir durch mehrmalige Destillation mit Toluol p.A.. Mit CH₂Cl₂ wurde nach Zusatz von 3 ml Wasser dreimal ausgeschüttelt. Die zur Trockne eingeengte CH₂Cl₂-Phase wurde in 20 µl Chloroform gelöst und zur Gaschromatographie (bzw. GC/MS-Analyse) verwendet.

2.3. Proteinbestimmung

Nach LOWRY (163)

Reagentien: alkalisches Kupferreagens

1 ml 2 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$

1 ml 2 % K,Na-tartrat

20 ml 10 % Na_2CO_3 in 0,5N NaOH

Folin-Ciocalteus-Phenolreagens

Fa. Merck Art.Nr. 9001

1:10 mit H_2O verdünnt

Standard: Rinderserumalbumin in Konzentration von 10 bis 150 μg Protein pro ml

Proben mit ca. 10 bis 200 μg Protein wurden in 1 ml Wasser gelöst und 1 ml alkalisches Kupferreagens zugegeben. Nach fünf Minuten wurde 3 ml verdünntes Folin-Ciocalteus-Phenolreagens zupipettiert und sofort gemischt. Nach 45 min wurde die Extinktion der Lösung gegen einen gleich behandelten Blindwert gemessen und der Proteingehalt anhand der Eichgerade mit Rinderserumalbumin bestimmt.

VI. Zusammensetzung und Chargennummern der untersuchten Fertigpräparate (nach Angaben der Hersteller)

1. Asgoviscum^R liquid.

100 g enthalten: Alkoholischer Auszug 1:5 aus

Hb. Visci albi 75,0 g

Fruct. Crataegi oxyac. et monog. 7,5 g

Bulb. Allii sat. 0,3 g

Trihydroxymethylrutin 1,0 g

2. Asgoviscum forte^R liquid.

100 g enthalten: Alkoholischer Auszug 1:3 aus

Hb. Visci albi 45,0 g

Fruct. Crataegi oxyac. et monog. 4,5 g

Bulb. Allii sat. 0,18 g

Rad. Rauwolfiae serp. ca. 30 g

(eingestellt auf 1,2 mg Rauwolfia-

Gesamtalkaloide pro ml)

Trihydroxymethylrutin 1,0 g

3. Kneipp^R Mistel Pflanzensaft

Ch.-B- 3-540 (1984) und 0-87 (1981)

Saft aus frischem Mistelkraut, Hb. Visci albi recens

4. Kneipp^R Pflanzen Dragees "Mistel"

Ch.-B. 3-400 (1984) und 0-1162 (1981)

1 Drg. enth.: 200 mg Mistelkraut

25 mg getr. Kaltmazerat aus Mistelkraut 4:1

5. Viscysat^R Bürger liquid.

Ch.-B. 8210 (1982)

100 g enth.: 85,0 g Preßsaft aus frischen Hb. Visci albi

1 g = 1 g des in der frischen Pflanze be-
stimmten Saftgehaltes

6. Plenosol^R-Primärextrakt

Untersucht wurde ein Primärextrakt der Fa. Madaus

7. Craviscum^R liquid.

Ch.-B. 80174

100 ml enth.: Extr. Hb. Crataegi oxyac. fluid.

(ethanol. Auszug 1:1) 33,3 ml

Extr. Hb. Visci albi fluid.

(ethanol. Auszug 1:1) 66,7 ml

8. Tonoplantin^R liquid.

Ch.-B. 3035 (1983)

100 ml enth.:	Extr. Crataegi oxyacanthi	60 ml
	Extr. Visci albi	40 ml
	standardisiert auf einen Gesamt- Flavonoidgehalt von 130 bis 140 mg	

9. Salus^R Kreislauf-Stärkungs-Kps.

Ch.-B. 12534 (1980)

1 Kps. enth.: 70 mg alkoholischen Extrakt aus 361,71 mg
Weißdornblüten, -blättern und -beeren, mit
mind. 0,8 mg Flavonglykosiden; 30 mg alko-
holischen Extrakt aus 180 mg Mistelkraut;
78 mg Knoblauchölmazerat (1:1)

10. Viscolind P^R Drg.

Ch.-B. 0221 (1972)

1 Drg. enth.:	Extr. Crataegi sicc.	50 mg
	Extr. Visci sicc.	30 mg
	Rutin	10 mg

11. Jumistan^R Tr.

Ch.-B. 1070 1

100 ml enth.:	wäßrig-alkoholischen Auszug aus:	
	Mistel	3,20 g
	Lavendelblüten	0,54 g
	Salbei	0,25 g
	Zinnkraut	0,40 g
	Haferstroh	0,20 g
	Sarsaparilla	0,18 g
	Holunder	0,20 g
	Hamamelis	0,12 g
	Weißdornfrüchte	0,50 g
	Weißdornblätter u. -blüten	0,25 g
	Orangenblüten	0,05 g
	Sumpfporst	0,05 g
	Oliveblätter	0,05 g
	Zitronen, frisch	2,50 g
	Orangen, frisch	2,50 g
	Knoblauch, frisch	1,50 g

12. Jumistan^R Kps.

Ch.-B. 94988

1 Kps. enth.:	Extr. Visci	9,00 mg
	Extr. Lavand.	1,60 mg
	Extr. Equiseti	1,25 mg
	Extr. Aven. sat.	1,25 mg
	Extr. Crataegi e fruct.	1,50 mg
	Extr. Crataegi e flor., fol.	1,50 mg
	Extr. Allii sat.	4,00 mg
	Extr. Hamamelidis	0,40 mg
	Knoblauchöl	44,00 mg

13. Verus^R Tr.

Ch.-B. 10901 (1981)

100 g enth.:	Tct. Hb. Visci alb. spir. (1:9)	40 g
	Tct. Frct. et Fol.	
	Crataegi oxyac. spir. 4+1 (1:9)	20 g
	Tct. Hb. Adonidis vern. spir. (1:9)	10 g
	Tct. Fol. Convall. maj. spir. (0,8:9)	10 g
	Tct. Frct. Juniperi comm. spir. (1:9)	5 g
	Tct. Fol. Salviae off. spir. (1:9)	10 g
	Tct. Rad. Arnicae mont. spir. (1:9)	10 g

VII. Meßdaten

1. Substanz A

Syringenin-4-0-B-D-apiofuranosyl-1→2-glucopyranosid

C₂₂H₃₂O₁₃ (504,23)

DC: R_f = 0,3 (LM DC-T1)

HPLC: R_t = 8,5 min (TS-2)

rel. Retention zu Resorcin*: 1,786

$$* \text{ Rel. Retention} = \frac{k'_s}{k'_{\text{Resorcin}}}; \text{ Kapazitätsverhältnis } k' = \frac{t_s - t_0}{t_0}$$

t₀: Totzeit, t_s: Bruttoretentionszeit

- UV (MeOH): $\lambda_{\max}$. 220 nm (ϵ -27000), 264 nm (ϵ -18000)
- MS: $C_{36}H_{46}O_{20}$ (798,728), Heptaacetat
 m/z : 252, 209, 194 (Aglykon); 331, 289, 271, 229, 169, 127, 109 (Hexosyl-); 259, 217, 157, 139, 115, 97 (Pentosyl-); 547 (Hexosyl-Pentosyl-)
- MS: $C_{29}H_{46}O_{13}$ (602,658), permethyliert
 m/z : 620 (+H₂O), 379, 347, 224, 187, 175, 155, 143, 129, 111, 101
- ¹H-NMR: (80 MHz, DMSO-d₆, Standard: TMS) δ (ppm)
 3,80 (C10,11-H); 4,13 d_{br} (C9-H); 4,9 d_{br} (C1'-H); 5,37 s_{br} (C1''-H); 6,30 - 6,55 m (C7,8-H); 6,73 s (C2,6-H)
- ¹³C-NMR: (75,47 MHz, CDCl₃, Standard: TMS; Heptaacetat)
 130,9 (C-1), 103,98 (C-2), 153,31 (C-3), 133,0 (C-4), 153,31 (C-5), 103,98 (C-6), 133,96 (C-7), 123,14 (C-8), 64,87 (C-9), 56,20 (C-11,12), 105,71 (C-1'), 62,28 (C-6'), 103,99 (C-1''), 84,31 (C-3''), 63,52 (C-3''')
- MS der Methylierungsanalyse:
 2,3,3'-Tri-O-methyl-1-4-di-O-acetylpentitol-d₁
 (Derivat der Apiose)
 m/z (rel. Int. %): 234 (1,5), 205 (0,5), 202 (1), 174 (4), 161 (14), 146 (2), 132 (9), 129 (6), 118 (34), 101 (46), 87 (10), 72 (7), 59 (4), 43 (100)
 3,4,6-Tri-O-methyl-1,2,5-tri-O-acetylhexitol-d₁
 (Derivat der Glucose)
 m/z (rel. Int. %): 234 (2), 205 (2), 190 (17), 161 (24), 145 (7), 130 (48), 129 (40), 101 (13), 100 (11), 88 (20), 43 (100)

2. Substanz B

Syringenin-4-O- β -D-glucopyranosid

$C_{17}H_{24}O_9$ (372,18)

Smp.: 190 °C

DC: Rf = 0,5 (LM DC-T1)

HPLC: Rt = 7,5 min (TS-T2)

rel. Retention zu Resorcin: 1,557

UV (MeOH): λ_{max} . 220 nm (ϵ 27240), 264 (ϵ 18274)

MS: $C_{27}H_{34}O_{14}$ (582,542), **Pentaacetat**
m/z: 582 (M^+); 252, 209 (Aglykon); 331, 289, 271, 229, 187, 169, 145, 127, 109 (Hexopyranosyl-)

1H -NMR: (80 MHz, DMSO- d_6 , Standard: TMS) δ (ppm)
6,55 s (C2,6-H); 6,53 d (C7-H, J = 15,6 Hz);
6,13 dt (C8-H, J = 15,6 und 5,8 Hz); 4,69 d (C9-H, J = 5,8 Hz); 3,81 s (-O-CH₃);
5-5,5 m (Zucker-H)

3. Substanz C

Syringaresinol-4,4'-O- β -D-digluco-pyranosid

$C_{34}H_{46}O_{18}$ (742,36)

DC: Rf = 0,4 (LM DC-T1)

HPLC: Rt = 18,2 min (TS-T2)

rel. Retention zu Resorcin: 4,007

UV (Diodenarray): λ_{max} . 206 nm, 238(sh) nm, 271 nm

1H -NMR: siehe (172)

4. Substanz D

Syringaresinol-4-O- β -D-glucopyranosid

$C_{28}H_{36}O_{13}$ (580,3)

DC: Rf = 0,7 (LM DC-T1)

HPLC: Rt = 26,4 min (TS-T2)

rel. Retention zu Resorcin: 5,863

UV (Diodenarray): λ_{max} . 206 nm, 238(sh) nm, 271 nm

VIII. Pharmakologische Untersuchungen - Messung der cAMP-Phosphodiesterase-Hemmung

Die erste Testserie wurde bei der Fa. Merck, Darmstadt, mit einer aus Hundeherz hergestellten Phosphodiesterase (PDE I und II) durchgeführt. Die zweite Testreihe (bei Prof. Dr. Anton, Straßburg) erfolgte mit einer PDE aus menschlichen Thrombocyten nach der Methode von WELLS und Mitarb. (171).

Die Reaktionslösung enthielt 48 mM Tris/HCl (pH 7,5), 2 mM $MgCl_2$, 10 μM $CaCl_2$, 1 mg/ml Human-Serumalbumin und eine genügende Menge gereinigtes Calmodulin oder/und 0,2 mM EGTA. Nach der Zugabe der PDE-Präparation und des Substrats wurde bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25 μl wäßriger Lösungen von 50 mM EDTA, 30 mM Theophyllin, 10 mM cAMP, 10 mM cGMP und 100 mM Tris/HCl (pH 7,5) beendet. Nach Zufügen von 10 μl Crotalus Atrox-Gift (20 mg/ml) wurde für 20 min bei 37 °C inkubiert, anschließend die Reaktionsmischung auf 1 ml mit einer wäßrigen Lösung von 0,1 mM Guanosin und 15 mM EDTA verdünnt. Die Tritium-markierten dephosphorylierten Produkte wurden mit einer kleinen QAE-Sephadexsäule abgetrennt und in 10 ml einer ACS-II-Scintillationsflüssigkeit (Amersham, U.K.) gemessen.

Die Extrakte wurden in DMSO (100 mg/ml) gelöst, dreimal in Pufferlösung (s. o.) verdünnt und zum Entfernen unlöslicher Stoffe zentrifugiert. Der Test wurde mit 1 μM cAMP als Substrat bei einer Konzentration von 200 μM EGTA durchgeführt.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1) GILL, L.S. und HAWKSWORTH F.G.: Techn. Bulletin No. 1242, U.S. Dept. of Agriculture, Washington D.C. (1961)
- 2) HEGI, G.: "Flora von Mitteleuropa", Bd. III/1, 309-322, Carl Hauser Verlag, München (1958)
- 3) HAGERS Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Hrsg. LIST, H.P. und HÖRHAMMER, L., Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 4. Ausgabe (1979)
- 4) v. TUBEUF, K.: "Monographie der Mistel", Oldenbourg Verlag, München und Berlin (1923)
- 5) BOONSONG, C. und WRIGHT S.E.: Aust. J. Chem. 14, 449 (1961)
- 6) MADAUS, G.: "Lehrbuch der biologischen Heilmittel", Abteilung I: Heilpflanzen, Bd. III, 2833, Thieme-Verlag, Leipzig (1938)
- 7) JORDAN, E.: Dissertation, Universität München (1985)
- 8) FUCHS: "Hippokrates Sämtl. Werke", Bd. 2, 521; Zit. nach (6)
- 9) PARACELSUS: "Sämtl. Werke", Bd. 2, 619; Zit. nach (6)
- 10) LONICERUS: "Kreuterbuch", 133 D (1564); Zit. nach (6)
- 11) STEINER, R.: "Geisteswissenschaft und Medizin", 189-195, Phil. Anthr. Verlag, Dornach/Schweiz (1920)
- 12) Verein für Krebsforschung: "Richtlinien für die Iscador^R-Behandlung", Arlesheim/Schweiz; Zit. nach (7)
- 13) KOCH, F.E.: Z. Gesamte Exp. Med. 193, 740 (1938)
- 14) CHERNOV, W.A.: Tr. Akad. Nauk. USSR, Vopr. Onkol. 7, 139 (1954); Zit. nach (7)
- 15) WINTERFELD, K., SELAWRY, O.S., GRUNTHAL, M. und SCHWARZ, M.R.: Arzneim.-Forsch. 13, 29-33 (1963)
- 16) VESTER, F. et al.: Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 495-511 (1968)
- 17) PARK: The practioner, 271, 348 (1881)
- 18) GAULTIER, R. und CHEVALIER, J.: C. R. Acad. Sci. 145, 941 (1907)
- 19) BIJLSMA, U.G.: Arch. Néerl. Physiol. 11, 141 (1927)
- 20) FRANZ, H.: Pharmazie 40, Heft 2, 97 (1985)
- 21) SAJNER, J. und VERIS, O.: Pharmazie 12, 84 (1957)
- 22) SAMUELSSON, G.: DAZ 19, 547 (1961)
- 23) SAMUELSSON, G.: Svensk. farm. Tidskr. 63, 545-53 (1959)
- 24) KRZACZEK, T.: Ann. Univ. Marie Curie-Słodowska, Sect. D, 32, 281-91 (1977); Zit. nach C.A. 89:56433y
- 25) PORA, A., POP, E., ROSKA, D. und RADU, A.: Pharmazie 12, 528 (1957)
- 26) HOPPE, H.A.: "Drogenkunde", Bd. 1, 1135, 8. Auflage, Walter de Gruyter Verlag, Berlin, New York (1975)
- 27) "HOMÖOPATHISCHES REPETITORIUM", 308, Deutsche Homöopathie-Union, Karlsruhe (1983)
- 28) "ROTE LISTE 1986", Hrsg.: Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie e.V., Editio Cantor, Aulendorf (1986)

- 29) WINTERFELD, K. und BIJL, H.: Liebigs Ann. Chem. 561, 107 (1948)
- 30) WINTERFELD, K. und LEINER, M.: Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmakol. 289, 358-364 (1956); Zit. nach (7)
- 31) SAMUELSSON, G. und PETTERSON, B.: Acta Chem. Scand. 24 2751 (1970)
- 32) WINTERFELD, K. und LEINER, M.: Arch. Pharm. 289 (61), 7, 359 (1956)
- 33) GRUNTHAL, M.: Dissertation, Universität Bonn (1959); Zit. nach (7)
- 34) VESTER, F.: Krebsgeschehen 5, 106 (1977)
- 35) NIENHAUS, J., STOLL, M. und VESTER, F.: Experientia (Basel), 26, 523 (1970)
- 36) FRANZ, H., ZISKA, P. und KINDT, A.: Biochem. J. 195, 481-484 (1981)
- 37) LUTHER, P.: "Lektin und Toxin der Mistel", Akademie-Verlag, Berlin (1982)
- 38) OLSNES, S.: STIRPE, F., SANDVIG, K. und PHIL, A.: J. Biol. Chem. 257, 13263 (1982)
- 39) MANGENOT, G., REBIFFE, J. und ROUDIER, A.: Comp. rend. hebdom. Séances Acad. Sci. 227, 439-41 (1948)
- 40) MÜLLER, J.: "Verfahren zur Gewinnung eines Arzneimittels", Deutsches Patentamt, Auslegeschrift 1130112 der Ciba AG, Basel (1962); Zit. nach (7)
- 41) KRZACZEK, T.: Ann. Univ. Marie Curie-Slodowska, Sect. D, 31, 281-90 (1976); Zit. nach C.A. 89:56442a
- 42) SCHINDLER, H.: "Inhaltsstoffe und Prüfungsmethoden homöopathisch verwendeter Heilpflanzen", Editor Cantor, Aulendorf (1955)
- 43) TRONCHET, J.: Ann. Sci. Univ. Besancon, Bot. 13, 3-7 (1972); Zit. nach C.A. 82:108797x
- 44) BECKER, H. und EXNER, J.: Z. Pflanzenphysiol. 97, 417-428 (1980)
- 45) BECKER, H. und EXNER, J.: Flavonoids, Bioflavonoids, Proc. Hung. Bioflavonoid Symp., 5th, 285-9 (1977)
- 46) EXNER, J.: Dissertation, Universität Heidelberg (1978)
- 47) BECKER, H., EXNER, J. und SCHILLING, G.: Z. Naturforsch., C. Biosci. 33 C (9-10), 771-3 (1978); Zit. nach C.A. 90: 51384u
- 48) EXNER, J. und BECKER, H.: Journal of Nat. Prod. 47 (6), 1054 (1984)
- 49) OHTA, N. und YAGISCHITA, K.: Agr. Biol. Chem. 34 (6), 900-907 (1970)
- 50) GRAZIANO, M.N., WIDMER, G.A., JULIANI, R. und COUSSIO, J.D.: Phytochemistry 6 (12), 1709-11 (1967)
- 51) TS'ENG, K.F. und CH'EN, C.-L.: Yao Hsüeh Pao 5, 317-25 (1957); Zit. nach C.A. 55: 24734
- 52) DOSSAJI, S.F., BECKER, H. und EXNER, J.: Phytochemistry 22 (1), 311-312 (1983)
- 53) HODISAN, V.: Clujul. Med. 56 (4), 377-80 (1983); Zit. nach C.A. 100:65050u

- 54) KRZACZEK, T.: Ann. Univ. Marie Curie-Slodowska, Sect. D, 33, 285-9 (1978); Zit. nach C.A. 92:194487g
- 55) VESTER, F. und MAI, W.: Hoppe Seyler's Z. Physiolog. Chem. 322, 273 (1960)
- 56) TYIHAK, E.: Herba Pol. 16 (3), 321-8 (1970); Zit. nach C.A. 75:59792m
- 57) WAGNER, H., BLADT, S. und ZGAINSKY, E.M.: "Drogenanalyse", Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1983)
- 58) WINTERFELD, K.: Pharmaz. Industrie 9, 37 (1942)
- 59) WINTERFELD, K. und KRONENTHALER, A.: Arch. Pharm. 280, 103 (1942)
- 60) BECKER, H. und SCHWARZ, G.: Planta med. 20, 4, 357 (1971)
- 61) WINTERSTEIN, A. und HÄMMERLE, W.: Hoppe Seyler's Z. Physiolog. Chem. 199, 56 (1931)
- 62) MEYER et al.: Helv. Chim. Acta 31, 1868 (1948)
- 63) RIKOVSKY, I.I. und BESARIC, R.: Bull. Soc. Chim. Belgrade 13, 211-18 (1948); Zit. nach C.A. 46:4610f
- 64) PLUVIER, V.: Compt. rend. 237, 1761-3 (1953); Zit. nach C.A. 48:5943f
- 65) SAKURAI, A. und OKUMURA, Y.: Rep. Fac. Sci., Shizuoka Univ. 6, 63-9 (1971); Zit. nach C.A. 77:58837j
- 66) TAGUCHI, M., SAKURAI, A. und OKUMURA, Y.: Rep. Fac. Sci., Shizuoka Univ. 8, 31-5 (1973); Zit. nach C.A. 81:88013u
- 67) BECKER, H. und NIMZ, H.: Z. Pflanzenphysiol. 72 (1), 52-63 (1974)
- 68) NIMZ, H., LÜDEMANN, H.-D. und BECKER, H.: Z. Pflanzenphysiol. 73, 226-33 (1974)
- 69) SUBRAMANIAN, S.S.: "Advancing Frontiers in the Chemistry of Natural Products", Hind. Publ. Corp. Jawahar Nagar, Delhi, 231 (1965)
- 70) HODISAN, V. und GRECU, L.: Farmacia 30 (3), 173-8 (1982)
- 71) HOFSTETTER, M.: Dissertation, ETH Zürich 7798 (1985)
- 72) TSCHESCHE, R., LAMPERT, F. und SNATZKE, G.: J. Chromatogr. 5, 217-24 (1961)
- 73) PETRIČIĆ, J. und KALOGJERA, Z.: Acta Pharm. Jugosl. 30, 163 (1980)
- 74) SELIGMANN, O.: Dissertation, Universität München (1977)
- 75) HEYNS, K., GRÜTZMACHER, H.F., SCHARMANN, H. und MÜLLER, D.: Fortschr. Chem. Forsch. 5 (3), 448-490 (1966)
- 76) PROKSCH, A.: Dissertation, Universität München (1982)
- 77) BAILEY, R.W. und BOURE, E.J.: J. Chromatogr. 4, 206 (1960)
- 78) WAGNER, H.: in "Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe", 31, 153, Hrsg. Zechmeister, L., Springer-Verlag Wien, New York (1974)
- 79) HUDSON, C.S.: Adv. Carbohydrate Chem. 4, 57 (1949)
- 80) WAGNER, H. und DEMUTH, G.: Z. Naturforsch. 29 c, 204-208, (1974)
- 81) SESHADRI, T.R. und VYDEESWARAN, S.: Phytochemistry 10, 667 (1971)
- 82) MALHOTRA, A., MURTI, V.V.S. und SESHADRI, T.R.: Tetrahedron 23, 405-409 (1967)

- 83) HÖSEL, W. und BARZ, W.: *Phytochemistry* 9, 2053 (1970)
- 84) SHERIHA, G.M. und ABOU AMER, K.M.: *Phytochemistry* 23 (1), 151-53 (1984)
- 85) GROSS, G.-A.: Dissertation, ETH Zürich 7800 (1985)
- 86) HATTORI, S. und IMASEKI, H.: *J. Amer. Chem. Soc.* 81, 4424 (1959)
- 87) BELL, D.J., ISHERWOOD, F.A. und HARDWICK, N.E.: *J. Chem. Soc.* 3702-6 (1954)
- 88) BELL, D.J.: in "Methods of Carbohydrate Chemistry", Vol. 1, 260, Hrsg. Whistler, R.L. und Wolfrom, M., Akad. Press, New York (1962)
- 89) DUFF, R.B.: *Biochem. J.* 94, 768 (1965)
- 90) NORDSTRÖM, C.G., SWAIN, R. und HAMBLIN, A.J.: *Chem. Ind.* 85 (1953)
- 91) HAWORTH, W.N.: *J. Chem. Soc. (London)* 107, 8 (1915)
- 92) PURDIE, T. und IRVINE, J.C.: *J. Chem. Soc. (London)* 83, 1021 (1903)
- 93) HAKOMORI, S.-J.: *J. Biochem. (Tokyo)* 55 (2), 205 (1964)
- 94) JANSSON; P.-E., KENNE, L., LIEDEGREN, H., LINDBERG, B. und LÖNNGREN, J.: *Chem. Commun. (Stockholm Univ.)* 8 (1976)
- 95) HEUR, Y.H.: Dissertation, Universität München (1983)
- 96) OVODOV, Yu.S., FROLOVA, G.M., DZIZENKO, A.K. und LITVINENKO, V.I.: *Izv. Akad. Nauk. SSR, Ser. Khim.* 6, 1370-2 (1969)
- 97) EGLOFF, C.P.: Dissertation, ETH Zürich 7138 (1982)
- 98) BECK, E.: in "Plant Carbohydrates I", Hrsg. Loewus, F.A. und Tanner, W., Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1982)
- 99) HULYALKAR, R.K., JONES, J.K.N. und PERRY, M.B.: *Canad. J. Chem.* 43, 2085 (1965)
- 100) KARRER, W.: "Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe", Birkhäuser Verlag Basel, Stuttgart (1958)
- 101) SWAIN, T.: "Chemical Plant Taxonomy", 343, Akad. Press, London, New York (1963)
- 102) GIBBS, R.D.: "Chemotaxonomy of Flowering Plants", Vol. I, 640, McGill-Queen's University Press, Montreal, London (1974)
- 103) WEHMER, C.: "Die Pflanzenstoffe", Bd. 2, 949, Gustav Fischer Verlag, Jena (1931)
- 104) WAGNER, H., HEUR, Y.H., OBERMEIER, A., TITTEL, G. und BLADT, S.: *Planta Med.* 44, 193 (1982)
- 105) MONTIES, B.: in "Annual Proceedings of the Phytochemical Society of Europe", 25, 161, Hrsg. Van Sumere, C.F. und Lea, P.J. (1985)
- 106) MACRAE, W.D. und TOWERS, G.H.N.: *Phytochemistry* 23 (6), 1207-20 (1984)
- 107) JOLAD, S.D., HOFFMANN, J.J., TEMPESTA, M.S. COLE, J.R. und BATES, R.B.: *J. Org. Chem.* 45, 1327-29 (1980)
- 108) DICKEY, E.E.: *J. Org. Chem.* 23, 179-84 (1958)
- 109) FREUDENBERG, K. und NEISH, A.C.: "Constitution and Biosynthesis of Lignin", Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1968)

- 110) HARBORNE, J.B.: "Biochemistry of Phenolic Compounds", Acad. Press, London, New York (1964)
- 111) TOTH, L.: "Chemie der Räucherung", Verlag Chemie (1985)
- 112) VESTER, F.: Umschau 70, 17 (1970)
- 113) STANEK, J. et al.: "The Monosaccharides", Akad. Press, New York (1983)
- 114) MICHEEL, F.: "Chemie der Zucker und Polysaccharide", 15. Aufl., Akad. Verlagsgesellschaft Geest u. Portig, Leipzig (1956)
- 115) WAGNER, H., TITTEL, G. und BLADT, S.: Dtsch. Apoth. Ztg. 123, 515 (1983)
- 116) TITTEL, G. und WAGNER, H.: in "Proceedings of the International Bioflavonoid Symposium, München", Verlag der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, Budapest (1982)
- 117) TITTEL, G. und WAGNER, H.: in "Practice of High Performance Liquid Chromatography", Hrsg. Engelhard, H., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo (1986)
- 118) LEA, A.G.H.: J. Chromatogr. 194, 62-8 (1980)
- 119) CASTEELE, K. V., GEIGER, H., DE LOOSE, R. und VAN SUMERE, C.F.: J. Chromatogr. 259, 291-300 (1983)
- 120) LEA, A.G.H.: J. Chromatogr. 238, 253-7 (1982)
- 121) MIETHING, H.: Dtsch. Apoth. Ztg. 125, 2049 (1985)
- 122) MICHAELLES, E.: Dissertation, Universität München (1974)
- 123) WAGNER, H.: "Pharmazeutische Biologie", Bd. 2: Drogen und ihre Inhaltsstoffe", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 3. Aufl. (1985)
- 124) BOEHME, H. und HARTKE, K.: Deutsches Arzneibuch, 7. Ausgabe, Kommentar, Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft, Stuttgart, Govi-Verlag, Frankfurt (1968)
- 125) KUHNZ, W., ZECH, K., LUPP, R., JUNG, G. und VOELTER, W.: J. Chromatogr. 272, 333-40 (1983)
- 126) KUHNZ, W., JUNG, G. und VOELTER, W.: in "Proceedings of the International Bioflavonoid Symposium, München", Verlag der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, Budapest (1982)
- 127) WAGNER, H. und BLADT, S.: "Pharmazeutische Biologie" (Praktikumsskript), 54, 2. Ausg. (1983)
- 128) EKSBERG, S., LAGERSTRÖM, P.-O., MODIN, R. und SCHILL, G.: J. Chromatogr. 83, 99 (1973)
- 129) CROMMEN, J., FRÄNSSON, B. und SCHILL, G.: J. Chromatogr. 142, 283 (1977)
- 130) WAHLUND, K.G.: J. Chromatogr. 115, 411 (1975)
- 131) Firmenschrift WATERS Assoc.: "Ionenpaarchromatographie" (1980)
- 132) KREUTZKAMP, B.: Dissertation, Universität München (1984)
- 133) BOEHME, H. und HARTKE, K.: Deutsches Arzneibuch, 8. Ausgabe, Kommentar, Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft, Stuttgart, Govi-Verlag, Frankfurt (1978)
- 134) SCHWENDINGER, J., SCHAAF, D. und MARSCHALL, B.: "Haltbarkeits- und Herstellungsdaten deutscher Arzneimittel", Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart (1985)

- 135) BECKER, H., EXNER, J. und BINGLER, T.: J. Chromatogr. 172, 420 (1979)
- 136) LIM, C.K. und AYRES, D.C.: J. Chromatogr. 255, 247 (1983)
- 137) GEISSMANN, T.A.: "The Chemistry of Flavonoid Compounds" Pergamon Press (1962)
- 138) MARKHAM, K.R.: "Techniques of Flavonoid Identification", Acad. Press (1982)
- 139) COUSIN und HERISSEY: Compt. rend. 146, 1413 (1908)
- 140) ERDTMAN, H.: Liebigs Ann. Chem. 503, 283-93 (1933)
- 141) ERDTMAN, H.: in "Moderne Methoden der Pflanzenanalyse", Bd. III, 428, Hrsg. Paech, K. und Tracy, M.V. (1955)
- 142) FREUDENBERG, K. HARKIN, J.M., REICHERT, M. und FUKUZUMI, T.: Chem. Ber. 91, 581 (1958)
- 143) FREUDENBERG, K.: in "Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe", 20, 68, Hrsg. Zechmeister, L., Springer-Verlag, Wien, New York (1962)
- 144) FREUDENBERG, K.: in "Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe", 11, 60, Hrsg. Zechmeister, L., Springer-Verlag, Wien, New York (1954)
- 145) FREUDENBERG, K. und SCHRAUBE, H.: Chem. Ber. 88, 16 (1955)
- 146) NIMZ, H., NAYA, K. und FREUDENBERG, K.: Chem. Ber. 96, 2086 (1963)
- 147) FREUDENBERG, K. und SCHUHMACHER, G.: Chem. Ber. 87, 1882 (1954)
- 148) FREUDENBERG, K. und RICHTZENHAIN, H.: Chem. Ber. 76, 997 (1943)
- 149) FREUDENBERG, K. und DIETRICH, H.: Chem. Ber. 86, 4 (1952)
- 150) FREUDENBERG, K. KRAFT, R. und HEIMBERGER, W.: Chem. Ber. 84, 472 (1951)
- 151) YAMASAKI, T., HATA, K. und HIGUCHI, T.: Mokuzai Gakkaishi, 19 (6), 299 (1973)
- 152) GÖTTLIEB, O.R.: Phytochemistry 11, 1537-70 (1972)
- 153) SIH, C.J., RAVIKUMAR, P.R., HUANG, F.-C., BUCKNER, C. und WHITLOCK, H.Jr.: J. Am. Chem. Soc. 98, 17, 5412 (1976)
- 154) NIKAIDO, T., OHMOTO, T., KINOSHITA, T., SANKAWA, U., NISHIBE, S. und HISADA, S.: Chem. Pharm. Bull. 29, (12) 3586 (1981)
- 155) NIKAIDO, T., OHMOTO, T., NOGUCHI, H., KINOSHITA, T., SAITO, H. und SANKAWA, U.: Planta Med. 43, 18 (1981)
- 156) MUTSCHLER, E.: "Arzneimittelwirkungen", 4. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (1981)
- 157) FORTH, W., HENSCHLER, D. und RUMMEL, W.: "Pharmakologie und Toxikologie", B.I.-Wissenschaftsverlag (1975)
- 158) PETKOV, E., NIKOLOV, N. und UZUNOV, P.: Planta Med. 43, 183-6 (1981)
- 159) BERETZ, A., JOLY, M., STOCLET, J.C. und ANTON, R.: Planta Med. 36, 193 (1979)
- 160) BERETZ, A., STOCLET, J.C. und ANTON, R.: Planta Med. 39, 236 (1980)
- 161) BERETZ, A., ANTON, R. und STOCKLET, J.C.: Experientia 34, 1054 (1978)

- 162) AMER, M.S. und KREIGHBAUM, W.E.: J. Pharm. Sci. 65 (1), 1 (1975)
- 163) LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. und RANDALL, P.J.: J. Biol. Chem. 193, 265 (1951); Zit. nach (164)
- 164) KAKAC, B. und VEJDELEK, Z.J.: "Handbuch der Kolorimetrie", Bd. III (1), 258, Fischer-Verlag, Jena (1966)
- 165) VOIGT, M. und WOLF, E.: Dtsch. Apoth. Ztg. 126, 591 (1986)
- 166) GREVEL, J.: Dissertation, Universität München (1982)
- 167) WAGNER, H., FEIL, B. und BLADT, S.: Dtsch. Apoth. Ztg. 124, 1429 (1984)
- 168) BLAICH, R.: "Analytische Elektrophoreseverfahren", Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1978)
- 169) CONNORS, K.A. und PANDIT, N.K.: Anal. Chem. 50, 1542 (1978)
- 170) MUNIER, R. und MACHEBOEUFF, H.: Soc. Chim. Biol. 33, 846 (1951)
- 171) WELLS, J.N., BAIRD, C.E., WU, Y.J. und HARDMANN, J.G.: Biochim. Biophys. Acta 384, 430 (1975)
- 172) BADAWI, M.M., HANDA, S.S., KINGHORN, A.D., CORDELL, G.A. und FARNSWORTH, N.R.: J. Pharm. Sci. 72, 1285 (1983)
- 173) SETCHEL, K.D.R., LAWSON, A.M., MITCHEL, F.L., ADLERCREUTZ, H., KIRK, D.N. und AXELSON, M.: Nature, 287, 740 (1980)
- 174) JORDAN, E. und WAGNER, H.: Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 36 (1), 428 (1986)
- 175) RANIERI, R.L. und McLAUGHLIN, J.L.: J. Chromatogr. 111, 234 (1975)
- 176) SCHILDKNECHT, H.: Nachr. Chem., Techn. Lab. 26 (5), 282-289 (1978); Zit. nach C.A. 89:103655j

Die vorliegende Arbeit entstand unter Leitung von Herrn Professor Dr. H. Wagner am Institut für Pharmazeutische Biologie in München.

Für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit möchte ich ganz besonders danken:

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. H. Wagner, für die Anregung zu dieser Arbeit, deren großzügige Förderung und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. R. Bauer, Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München, für seine große Hilfsbereitschaft und die vielen Tips aus seinem HPLC-Erfahrungsschatz.

Herrn Dr. Baumgarth, Fa. Merck, Darmstadt, sowie Herrn Prof. Dr. R. Anton und Herrn Dr. Beretz, Laboratoire de Pharmacognosie, Straßburg, für die rasche Durchführung der PDE-Teste.

Herrn Prof. Dr. J. Petričić, Zagreb, für die freundliche Überlassung von Vergleichssubstanzen.

Herrn Dr. O. Seligmann und Frau S. Meier, Institut für Pharmazeutische Biologie in München, für die Durchführung der physikalisch-chemischen Untersuchungen (MS, NMR, GC/MS).

Herrn Prof. Dr. W. Schäfer für die Durchführung von GC/MS-Analysen.

Herrn Dr. A. Neszmélyi und der Fa. Bruker, Karlsruhe, für die Aufnahme der 75,47 MHz ^{13}C -NMR-Spektren.

Dem Verein für Krebsforschung, Arlesheim, für die Überlassung einiger Drogenmuster sowie der Preß- und Gärssäfte.

Der Firma ICI-Pharma, Plankstadt, für die Überlassung einer größeren Menge Drogenmaterials sowie von Präparatemustern. Ebenso den Firmen Dr. Madaus & Co., Köln, und Kneipp-Heilmittel-Werk, Würzburg, für die Zusendung von Untersuchungsmaterial.

Darüber hinaus danke ich ganz herzlich allen nicht genannten Kolleginnen und Kollegen, insbesondere den HPLC-Kollegen, die in verschiedenster Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz besonders danke ich auch meiner Frau Centa für ihre ausdauernde Hilfsbereitschaft und ihr stetes Verständnis.

LEBENS LAUF

Bernhard Hermann Ernst Feil

geboren am 16.03.1958 in München

Eltern: Dr.-Ing. Hans A. Feil, Elektrotechniker
und Helga Feil, geb. Wieden

Familienstand: seit 02.04.1985 verheiratet mit
Centa Feil, geb. Oberlinner
Berufsschullehrerin

Schulbildung: 1964 - 1968 Senftenauer Volksschule,
München
1968 - 1976 Erasmus-Grasser-Gymnasium,
München

Abitur: 1976 München

Studium der Pharmazie: WS 1976/77 Ludwig-Maximilians-
bis Universität,
WS 1979/80 München

2. Abschnitt der
Pharmazeutischen Prüfung: April 1980, München

Pharmaziepraktikum: Mai 1980 bis Okt. 1980
Fa. Zyma GmbH, München
Nov. 1980 bis April 1981
Amadeus-Apotheke, München

3. Abschnitt der Pharma-
zeutischen Staatsprüfung: Juni 1981 in München

Approbation als Apotheker: August 1981

Tätigkeit in öffentlichen
Apotheken: August 1981 bis März 1983

Wissenschaftliche Tätigkeit: ab April 1983 am Institut für Pharma-
zeutische Biologie der Universität
München;
Promotionsarbeit unter Leitung von
Prof. Dr. H. Wagner

